

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TURGUT ÖZAL TIP MERKEZİNDE 2009 YILINDA
NOZOKOMİYAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ,
İNDÜKLENEBİLİR BETA-LAKTAMAZ VE METALLO
BETA-LAKTAMAZ ORANLARININ BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ahmet MANSUR
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Selma AY**

MALATYA–2010

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TURGUT ÖZAL TIP MERKEZİNDE 2009 YILINDA
NOZOKOMİYAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ,
İNDÜKLENEBİLİR BETA-LAKTAMAZ VE METALLO
BETA-LAKTAMAZ ORANLARININ BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ahmet MANSUR
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Selma AY**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TABLOLAR DİZİNİ.....	IV
RESİMLER DİZİNİ.....	VI
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Pseudomonaslar.....	4
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.2.1. Mikrobiyoloji.....	5
2.2.2. Epidemiyoloji.....	7
2.2.3. Patogenez.....	7
2.2.3.1. Adhezinler.....	8
2.2.3.2. Nöraminidaz.....	8
2.2.3.3. Ekzotoksin A.....	8
2.2.3.4. Piyosianin.....	9
2.2.3.5. Piyoverdin.....	9
2.2.3.6. Elastaz.....	9
2.2.3.7. Alkalın proteaz.....	10
2.2.3.8. Fosfolipaz C.....	10
2.2.3.9. Ekzoenzim S ve T.....	10
2.2.3.10. Lökositin.....	10
2.2.3.11. Enterotoksin.....	10
2.2.3.12. Quorum sensing.....	10
2.2.4. Klinik.....	11
2.2.4.1. Solunum Yolu İnfeksiyonları.....	11
2.2.4.2. Deri ve Yumuşak Doku İnfeksiyonları.....	11
2.2.4.3. Üriner Sistem İnfeksiyonları.....	12
2.2.4.4. Bakteriyemi ve Endokardit.....	13
2.2.4.5. Beyin Omurilik Sıvısı İnfeksiyonları.....	13
2.2.5. Antibiyotik Duyarlılığı.....	13
2.3. Efluks Pompa Sistemi.....	15
2.4. Dış Membran Porin Defektleri.....	16
2.5. Aminoglikozid Direnci.....	17

2.6. Florokinolon Direnci.....	17
2.7. Beta-Laktamaz Enzimlerine Bağlı Direnç.....	18
2.7.1. Kromozomal Kökenli Beta-Laktamazlar.....	18
2.7.1.1. AmpC Tipi İndüklenebilir Beta-Laktamaz Enzimleri(İBL).....	18
2.7.2. Plazmid Kökenli Beta-Laktamazlar.....	20
2.7.3. Sınıf A Karbenisilin Hidrolize Eden Beta-Laktamazlar.....	21
2.7.4. Sınıf A Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar(GSBL).....	21
2.7.5. Sınıf D Beta-Laktamazlar(Oksasilinazlar).....	23
2.7.6. Karbapenemazlar.....	24
2.7.6.1. Sınıf B Metallo-Beta-Laktamazlar.....	24
2.8. İndüklenebilir Beta-Laktamaz Enzimi Tanı Yöntemleri.....	27
2.8.1. Disk İndüksiyon Yöntemi	27
2.8.2. İndükleyici Ajanın Besiyerine Eklenmesi.....	27
2.9. Metallo-Beta-Laktamaz Enzimi Tanı Yöntemleri.....	27
2.9.1. Modifiye Hodge Testi.....	28
2.9.2. Çift Disk Sinerji Testleri.....	28
2.9.2.1. İmipenem-EDTA Çift Disk Sinerji Testi.....	28
2.9.2.2. CAZ-MPA, CAZ-SMA, IMP-EDTA-SMA Çift Disk Sinerji Testleri.....	29
2.9.3. Kombine Disk Testi.....	29
2.9.4. MBL E Test Yöntemi.....	30
2.9.5. EDTA+Fenantirolin+İmipenem Mikrodilüsyon Testi.....	30
2.9.6. Bakteriyel Hücre Ekstraktının Spektrofotometrik Analizi ile İmipenem Hidrolizinin Tespiti.....	30
2.9.7. MBL Tanısında Moleküler Yöntemler.....	31
3. MATERYAL VE METOD.....	32
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Tanımı.....	32
3.2. Mueller-Hinton Agar Besiyeri.....	33
3.3. Antibiyotik Diskleri.....	33
3.4. EDTA Solüsyonu(0,5 Molar).....	34
3.5. İmipenem ve Meropenem E Test Stripleri.....	34
3.6. MBL E Test Stripleri.....	34
3.7. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	34
3.8. İBL Üretiminin Araştırılması.....	35

3.9. MBL Üretiminin Araştırılması.....	35
3.9.1. Modifiye Hodge Testi.....	35
3.9.2. IMP/EDTA Kombine Disk Testi.....	36
3.9.3. IP/IPI E Test Yöntemi.....	
	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Epidemiyolojik Bilgiler.....	37
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları.....	38
4.3. Disk İndüksiyon Testi Sonuçları.....	41
4.4. Modifiye Hodge Testi, Kombine Disk Testi ve MBL E Test Sonuçları....	43
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
7. ÖZET.....	69
8. SUMMARY.....	71
9. KAYNAKLAR.....	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tıbbi yönden önemli <i>Pseudomonas</i> ların genotipik ve fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılması.....	5
Tablo 2. <i>P. aeruginosa</i> ’ da bulunan efluks pompa sistemleri.....	16
Tablo 3. Beta-laktamazların sınıflandırılması.....	19
Tablo 4. <i>P. aeruginosa</i> ’nın ürettiği GSBL enzimleri.....	22
Tablo 5. <i>P. aeruginosa</i> ’da bulunan MBL enzimleri.....	26
Tablo 6. 110 <i>P. aeruginosa</i> izolatının klinik örneklerle göre dağılımı.....	37
Tablo 7. 110 <i>P. aeruginosa</i> izolatının infeksiyonlara göre dağılımı.....	37
Tablo 8. 110 <i>P. aeruginosa</i> izolatının izole edildikleri servislere göre dağılımı...	38
Tablo 9. 110 <i>P. aeruginosa</i> izolatının antimikrobiyallere duyarlılığı.....	39
Tablo 10. 110 <i>P. aeruginosa</i> izolatının imipenem ve meropenem duyarlılığı...	39
Tablo 11. Karbapenemlere dirençli 29 <i>P. aeruginosa</i> izolatının klinik örneklerle göre dağılımı.....	40
Tablo 12. Karbapenemlere dirençli 29 <i>P. aeruginosa</i> izolatının servislere göre dağılımı.....	40
Tablo 13. Karbapenemlere dirençli 29 <i>P. aeruginosa</i> izolatının antimikrobiyallere duyarlılığı.....	41
Tablo 14. Karbapenemlere dirençli 29 <i>P. aeruginosa</i> izolatında ve standart suşta fenotipik testlerle MBL tespit sonuçları.....	44
Tablo 15. E test ve Kombine disk testi ile MBL pozitif bulunan iki <i>P. aeruginosa</i> izolatının test sonuçları.....	47
Tablo 16. E test ve Kombine disk testi ile MBL pozitif bulunan iki <i>P. aeruginosa</i> izolatının antimikrobiyallere duyarlılığı.....	47
Tablo 17. EARSS verilerine göre Avrupa ülkelerindeki <i>P. aeruginosa</i> Antimikrobiyal direnç oranları.....	51
Tablo 18. EARSS verilerine göre 2006-2009 yılları arasında Türkiye’deki <i>P. aeruginosa</i> suşlarının antimikrobiyallere direnç oranları	52
Tablo 19. Türkiye’de yapılmış çeşitli çalışmalardaki <i>P. aeruginosa</i> suşlarının antimikrobiyallere direnç oranları.....	52
Tablo 20. Türkiye’de ve hastanemizde yapılan çalışmalardaki <i>P. aeruginosa</i> ve <i>Pseudomonas</i> spp. antimikrobiyal direnç oranları.....	54
Tablo 21. Türkiye’de yapılmış çalışmalarda İBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> oranları...	57

Tablo 22. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında imipenem/EDTA Kombine disk testi	
duyarlılık ve özgüllük oranları.....	62
Tablo 23. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında MBL(IP/IPI) E test duyarlılık ve özgüllük	
oranları.....	62

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. İBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatı(imipeneme dirençli).....	41
Resim 2. İBL pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatı(imipeneme duyarlı).....	42
Resim 3. İBL negatif <i>P. aeruginosa</i> izolatı.....	42
Resim 4. İBL üretiminin değerlendirilemediği <i>P. aeruginosa</i> izolatı.....	43
Resim 5. Modifiye Hodge testi.....	44
Resim 6. MBL E test ve Kombine disk testi ile <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 negatif kontrol.....	45
Resim 7. MBL E test ve Kombine disk testi ile MBL pozitifliği.....	45
Resim 8. MBL E test ve Kombine disk testi ile MBL negatifliği.....	46
Resim 9. MBL E test negatif, Kombine disk testi pozitif izolat.....	46

KISALTMALAR DİZİNİ

AHLs	: Açıl homoserin lakton molekülleri
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CAZ	: Seftazidim
EARSS	: European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
ETA	: Ekzotoksin A
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
IMP	: İmipenem
IP/IPI	: İmipenem/İmipenem+ Etilendiaminotetraasetik asit
İBL	: İndüklenebilir beta-laktamaz
MBL	: Metallo-beta-laktamaz
MDR	: Multi drug resistance
MHA	: Mueller-Hinton agar
MPA	: 2-merkaptopropionik asit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SMA	: Sodyummerkaptoasetik asit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hastane infeksiyonları morbidite ve mortalite oranlarının yüksekliği yanında ekonomik maliyeti nedeni ile tüm dünyada önemli bir sorun olmaya devam etmektedir [1]. Ülkemizde gerçekleştirilen NosoLINE projesi hastane infeksiyonlarının Türkiye’de yaygın olduğunu(insidansı % 1 ile 8.6 arasında değişmekte) ve infeksiyonların çoğunluğunun yoğun bakım ünitelerinde geliştiğini göstermiştir [2]. Ayrıca, ülkemizde yapılan çalışmalarda hastane infeksiyonlarının hasta başına ortalama 442 \$ ek maliyet getirdiği ve hastanede kalış süresini 4-10.6 gün kadar arttırdığı gösterilmiştir [3;4].

Virüsler, mantarlar ve parazitler hastane infeksiyonuna neden olabilirlerse de, bakteriyel etkenler hastane infeksiyonlarının en yaygın nedeni olarak kabul edilmektedir [5]. *Enterobacteriaceae* ailesinden bakteriler, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* sırasıyla hastane infeksiyonlarından en sık izole edilen etkenlerdir [6]. *P. aeruginosa*’nın hastane infeksiyonlarının % 10’unda etken olduğu bildirilmektedir [7]. *P. aeruginosa* özellikle kistik fibrozisli, nötropenik, iyatrojenik immünsupresyonu olan ya da koruyucu anatomik bariyerleri bozulmuş olan yatan hastaları etkileyen ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır. Sağlıklı insanlarda nadir olarak normal florada bulunabilir ve uygun koşullar oluştuğunda hastalık etkeni olabilmektedir [8]. Özellikle uzun süre hastanede yatan ve geniş spektrumlu antimikrobiyal tedavi veya kanser kemoterapisi alan hastalarda *P. aeruginosa* ile kolonizasyon oranları artmaktadır [9].

P. aeruginosa birçok antimikrobiyal ilaca doğal olarak dirençli olup, mevcut kullanılabilen antimikrobiyallere direnci de hastanelere göre değişebilmektedir. İnfeksiyonların tedavisi sırasında antibiyotiklere direnç geliştirebilmesi, tedavi güçlüğüne neden olmakta ve direnç profilinin sürekli izlenmesini gerektirmektedir [10].

P. aeruginosa'nın antimikrobiyallere direncinde kromozomal ve plazmid kaynaklı beta-laktamazların üretimi, antimikrobiyal hedeflerinde değişiklik, porin proteinlerindeki değişiklik sonucu dış membran geçirgenliğinin azalması, efluks pompa sistemi ile antimikrobiyal ilacın dışarı atılması başlıca direnç mekanizmalarıdır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar(GSBL) ve AmpC tipi beta-laktamazların yanı sıra imipenem ve/veya meropenemi hidrolize edebilen karbapenemazlar nedeniyle tedavi seçenekleri azalmaktadır. Karbapenemaz enzimleri Ambler'in moleküler sınıflandırmasına göre A, B ve D grubu olarak adlandırılır. B grubu karbapenemaz enzimleri aktif bölgelerinde taşıdıkları metal iyonları nedeniyle metallo-beta-laktamazlar(MBL) olarak adlandırılır [11].

Ambler sınıflandırmasındaki karbapenemaz enzimleri içerisinde klinik yönden en önemli olanları B grubu MBL enzimleridir. Çünkü aztreonam hariç tüm beta laktam antibiyotikleri hidrolize edebilen MBL enzimlerini kodlayan genler plazmid ve integronlarda lokalize olabilmekte, bu durum direncin diğer bakterilere aktarılmasını mümkün kılmaktadır [12]. Bu şekilde MBL enzimlerinin nonfermenter Gram negatif patojenler arasında yayılması küresel bir sorun haline gelmiştir [13].

Bush sınıflamasına göre Grup I beta-laktamazlar(AmpC tipi enzimler), indüklenebilir özelliktedir, Gram negatif bakterilerde geniş spektrumlu penisilin ve sefalosporinlere direnç gelişiminden sorumlu tutulmaktadır [14]. Normalde bakteri tarafından az miktarda sentezlenen bu enzim ortamda bulunan bir indükleyicinin etkisi ile yüksek miktarlarda sentezlenmeye başlamakta, indükleyicinin etkisi ortadan kalkınca enzim üretimi tekrar bazal seviyeye düşmektedir. İndüklenebilir beta-laktamaz(İBL) üreten bakterilerde beta laktam antibiyotiklerle tedavi sırasında, yüksek düzeyde enzim üretebilen dereprese mutantların seleksiyonu ise ayrı bir öneme sahiptir [15]. *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere direncinde beta-laktamaz ve karbapenemaz üretimine ek olarak multi drug efluks pompa sistemlerinin upregülasyonu ve porin kanallarında daralmaya neden olan hücre duvarı değişiklikleri ile DNA giraz enzim mutasyonları da etkilidir [16].

Hastanelerde *P. aeruginosa* 'nın neden olduğu hastane infeksiyonlarında rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile direnç profili ve suşların beta-laktamaz üretimleri de izlenmelidir. Böylece uygun antibiyotik seçimi ile tedavi başarısı artırılabilir ve infeksiyon kontrol önlemlerinin zamanında, hızlı ve etkin olarak uygulanması sağlanarak, dirençli suşların seleksiyonu önlenabilir [10;17;18].

Bu alışmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Turgut Özal Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarında nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında çeşitli antimikrobiyallere direnç oranlarının, İBL ve MBL üretiminin araştırılması amaçlanmıştır. Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında antimikrobiyallere direnç oranlarının belirlenmesi ampirik tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayacaktır. İzolatlardaki İBL üretiminin saptanması *P. aeruginosa* infeksiyonlarının etkin kombinasyonlar ile tedavilerini sağlayacak, böylece dereprese mutantların oluşumunu ve yayılımını engellemek mümkün olacaktır. Karbapeneme dirençli izolatlarda MBL üretiminin farklı fenotipik yöntemlerle araştırılması duyarlı, kolay uygulanabilen ve maliyet yönünden etkin bulunan testlerin rutin kullanıma sunulmasını sağlayacaktır. Böylece MBL üreten suşların hızla saptanması ve gerekli infeksiyon kontrol önlemlerinin alınması sayesinde, direncin diğerk Gram negatif bakteriler arasında yayılması önlenebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pseudomonaslar

Pseudomonaslar Gram negatif, hareketli, aerob bakteriler olup suda eriyen pigmentler üretirler. Toprak, su, bitki ve hayvanlarda bulunurlar. Grubun major patojeni olan *P. aeruginosa* insanların normal barsak florasında ve cilt florasında az miktarda bulunur. Diğer Pseudomonaslar ise seyrek olarak hastalık nedenidir [19].

İlk kez 1850 yılında yaralı askerlerin pansuman materyallerinde mavi püyük görülmesi üzerine bir Fransız cerrah tarafından fark edilen mikroorganizma, 1882’de *Bacillus pyocyaneus* olarak isimlendirilmiş; 1900 yılında ise *Pseudomonas* adını almıştır.

1984’e kadar 100’den fazla türü tanımlanmış olup, bunların çoğunun bitki patojeni olduğu gözlemlenmiştir. Aynı yıllarda rRNA homolojisine göre genotip olarak 5 subgruba ayrılmış, bugün için sadece rRNA grup 1 *Pseudomonas* genusu olarak kalmıştır [20].

Gilardi, Pseudomonasları fenotipik özelliklerine göre 7 major gruba ayırmıştır. Bugün için genotipik ve fenotipik özelliklerinin karmaşı şeklinde revize edilmiş sınıflandırma Tablo 1’de gösterilmiştir [19;21].

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa doğada yaygın olup, çoğunlukla hastanelerdeki nemli ortamlarda bulunmakta, normal insan florasında saprofit olarak kolonize olabilen bu bakteri konak savunmasının bozulduğu durumlarda hastalıklara neden olabilmektedir [19].

Tablo 1. Tıbbi yönden önemli *Pseudomonas*ların genotipik ve fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılması[19;21]

	Floresan grup	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i>
	Nonfloresan grup	Stutzeri grup <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas mendocina</i> CDC grup Vb-3
rRNA Grup 1		Alcaligenes grup <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Pseudomonas sp.</i> Grup 1
rRNA Grup II (Pseudomallei grup: Kolistin dirençli grup)		<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia cepacia complex</i> <i>Burkholderia gladioli</i> <i>Ralstonia species</i> <i>Pandorea species</i> <i>Cupriavidus species</i>
rRNA Grup III (Zayıf oksidaz pozitif grup)		<i>Comamonas species</i> <i>Acidovorax species</i> <i>Lautropia mirabilis</i> CDC WO-1
rRNA Grup IV (Diminuta grup)		<i>Brevundimonas species</i>
rRNA Grup V		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Sarı pigmentli grup		<i>Pseudomonas luteola</i> <i>Pseudomonas oryzae</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i>
H₂S pozitif grup		<i>Shewanella species</i>
Halofilik grup		<i>Alishewanella fetalis</i> <i>Halomonas venusta</i> CDC Halofilik nonfermenter grup 1

2.2.1. Mikrobiyoloji

P. aeruginosa tek polar flajeli sayesinde hareketli, düz veya hafif kıvrımlı çomak şeklinde, 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm boyutlarında, Gram negatif özellikte olup; boyamada sıklıkla çiftler, bazen de kısa zincirler halinde görülür. Zorunlu aerob olup, ortamda

arginin ya da nitrat gibi alternatif bir son elektron alıcısı mevcut olduğunda anaerop olarak da üreyebilir.

P. aeruginosa pek çok kültür ortamında kolayca ve hızla ürer. Ürettiği besiyerlerinde trimetilamin üretimine bağlı olarak üzüm benzeri koku oluşturabilir. Bazı suşlar kanlı agarda hemoliz yapar. Genellikle floresan veren yeşilimsi renkte, yuvarlak-yassı, kenarları düzensiz koloniler oluşturur. Besiyerine difüze olan, floresan vermeyen mavimsi renkte piyosyanin ve floresan veren sarı-yeşil renkli pyoverdin pigmenti üretirler. Diğer *Pseudomonas* türleri piyosyanin pigmenti üretemezler. Piyoverdin pigmenti floresan grubun diğer üyeleri olan *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas putida* tarafından da üretilebilir. Bazı suşlar koyu kırmızı piyorubin pigmenti ve kahverengi-siyah renkli piyomelanin pigmenti üretirler. Bu iki nadir pigmentin üretimi Tirozin Agar besiyerinde daha iyi gözlenebilir [19-22].

P. aeruginosa sahip olduğu farklı antibiyotik duyarlılık paternlerine, farklı biyokimyasal ve enzimatik aktivitelerine göre değişebilen pek çok koloni tipi oluşturabilir. Bunun tipik örneği kistik fibrozisli hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının aşırı miktarda aljinat ve ekzopolisakkarit oluşturmaya bağlı olarak mukoid koloniler meydana getirmesidir [19].

P. aeruginosa 10-44 °C ısı aralığında üreyebilmesine karşın en iyi 35 °C’de ürer, 4°C’de üreyememesi ve 42 °C’de üreyebilmesi ile floresan gruptaki diğer psikrofil *Pseudomonas*lardan olan *P. putida* ve *P. fluorescens*’den ayrılır [20]. Sahip olduğu sitokrom oksidaz enzimi nedeniyle oksidaz testi (Kovaks ayırıcı ile) pozitifdir. Nonfloresan sarı pigmentli grupta yer alan *Pseudomonas luteola* ve *Pseudomonas oryzihabitans* dışındaki *Pseudomonas*larda da oksidaz testi pozitifdir [21].

P. aeruginosa karbonhidratları fermente etmez, ancak pek çok tür başta glikoz olmak üzere diğer şekerleri oksidatif yolla metabolize edebilirler. Maltoza etkileri değişkendir, laktozu kullanmazlar. Aminoasitlerden arginini kullanır, lizini kullanmazlar. Üreye etkileri değişkendir, DNase testi negatiftir; esculini hidrolize etmez ve H₂S oluşturmazlar. Şekerlerin kullanımı, en iyi Amonyum tuz bazlı besiyerinde gösterilebilir [19-21].

P. aeruginosa’nın identifikasyonu genellikle koloni morfolojisi, Gram boyama, oksidaz testi, karakteristik pigment oluşumu, 42 °C’de üreyebilme özellikleri ve besiyerinde oluşturduğu üzüm benzeri kokuya dayanarak yapılır [19;21].

2.2.2. Epidemiyoloji

Pseudomonas farklı çevresel yerleşim gösteren fırsatçı bir patojendir. Çok az besine gereksinim duyan bu bakteriler 2-42° C arası ısıyı tolere edebilirler. Birçok antibiyotiğe ve dezenfektana dirençlidirler [22].

Hastanede yatan hastalardan *Pseudomonas* izole edilmesi kaygı vericidir ancak, kliniği desteklemiyorsa tedavi uygulanmasını gerektirmez. Klinik örneklerden *P. aeruginosa* dışında bir *Pseudomonas* saptanması, hastanın geçici kolonizasyonuna, örnek alınması veya laboratuvar uygulamaları sırasındaki bulaşmaya bağlı olabilmektedir [22].

Antiseptikler, dezenfektanlar, intravenöz sıvılar ve lens yıkama solüsyonları dahil hemen tüm hastane ekipmanları *P. aeruginosa* için kaynak olabilir. Kolonize olduğu bu kaynakların yetersiz sterilizasyonu sonucunda salgınlar oluşturabilir. Pek çok çalışmada hastane kaynaklı infeksiyonlardaki *P. aeruginosa* prevalansı % 10 olarak bildirilmektedir ancak bu prevalans; çeşitli vücut bölgelerine, ünitelerden üniteye ve farklı hastanelere göre değişmektedir. *P. aeruginosa*'nın nozokomiyal infeksiyonlar arasında en sık pnömونيye neden olduğu bildirilmektedir [20].

P. aeruginosa suşlarından elde edilen aşılar *Pseudomonas* sepsisine karşı koruma amacıyla yüksek risk grubundaki hastalara (immün yetmezlik, yanık, lösemi, kistik fibrozis) uygulanabilmektedir [19].

Hastane ortamının aksine, *P. aeruginosa* çamaşır makineleri haricinde normal ev ortamını nadiren kontamine eder. Sağlıklı insanlarda fekal taşıyıcılık seyrek olup (% 2-10), vejeteryan beslenmenin fekal taşıyıcılıkta muhtemelen etkili olduğu tahmin edilmektedir [20].

2.2.3. Patogenezi

P. aeruginosa özellikle müköz membranlar, cilt ve doku hasarı gibi doğal savunma sistemlerinin bozulduğu durumlarda; intravenöz veya üriner kateter varlığında; nötropenik hastalar ve kanser kemoterapisi alan hastalarda patojendir. Bakteri müköz membranlar ve ciltte kolonize olarak lokal invazyon yapar ve sistemik hastalık oluşturur. Bu süreç bakterinin pilusu, enzimleri ve toksinlerince desteklenir. Ateş, şok, oligüri, lökositoz, lökopeni, dissemine intravasküler koagülasyon ve adult respiratuar distres sendromu oluşumunda lipopolisakkaritlerinin doğrudan etkisi vardır.

P.aeruginosa ve diğer *Pseudomonaslar* pek çok antibiyotiğe dirençli olduklarından, normal floranın baskılandığı durumlarda floraya hakim hale gelirler [19].

P. aeruginosa yapısal bileşenler, toksin ve enzimler gibi birçok virülans faktörüne sahiptir. Virülans faktörlerindeki çeşitliliğe karşın, bilimsel çalışmalar *P. aeruginosa*'nın hastalık oluşturmada için birçok faktörün bir arada olması gerektiğini göstermektedir [22].

2.2.3.1. Adhezinler

İnfeksiyon oluşumunda konak hücreye yapışma önemlidir. *P. aeruginosa* yüzeyindeki en az 4 yapısal bileşen yapışmada görev almaktadır:

- 1- Flajella
- 2- Pilus
- 3- Lipopolisakkarit
- 4- Aljinat(kapsüler polisakkarit)

Flajella *P. aeruginosa*'nın hareketini, pilus mukoza hücrelerine yapışmayı sağlar. Lipopolisakkaridin lipid-A kısmı toksik etkiden sorumludur. Bakteri yüzeyinde kapsülde yer alan, mukoid ekzopolisakkarid yapıdaki aljinat mikroorganizmayı fagositozdan ve antibiyotik etkisinden korur. Aljinat üretimi mukoid *P. aeruginosa* kökenleri ile uzun dönem kolonize olan kistik fibrozisli hastalarda veya diğer kronik solunum yolu hastalarında etkili olmaktadır [22].

2.2.3.2. Nöraminidaz

Sialik asit rezidülerini GM1 gangliozid reseptörlerinin yapısından çıkararak, pililerin konak epitel hücresi yüzeyindeki GM1 gangliozid reseptörlerine yapışmasını kolaylaştırır [21].

2.2.3.3. Ekzotoksin A

P. aeruginosa tarafından üretilen en önemli virülans faktörlerinden birinin ekzotoksin A(ETA) olduğuna inanılmaktadır. ETA, *C .diphtheriae*'nın ürettiği difteri toksinine benzer bir etki ile ökaryotik hücrede elongasyon faktör 2'yi inhibe ederek protein sentezini bozmaktadır. Ancak, difteri toksini ile ETA arasında yapısal ve

immünolojik farklar vardır. ETA difteri toksininden daha zayıf etkilidir. ETA yanık yaralarındaki dermatonekroz, oküler infeksiyonlardaki korneal hasar ve kronik pulmoner infeksiyonlardaki doku hasarında rol oynamaktadır. Ayrıca bu toksin bağışıklık sistemini de baskılamaktadır [22].

2.2.3.4. Piyosiyanin

P. aeruginosa'nın ürettiği mavi bir pigment olan piyosiyanin serbest oksijen radikallerinin(hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu) üretimini katalize eder. Başta akciğer olmak üzere, özellikle iyi oksijenlenen organlarda oksidatif hasar oluşturur. Piyosiyaninin respiratuar silier aktivite ve diğer bakteriler üzerinde baskılayıcı etkisi vardır. Bu pigment, nötrofil aktivasyonunun artmasına öncülük eden interlökin-8 salınımını da uyarır [21;22].

2.2.3.5. Piyoverdin

Sarı-yeşil bir pigment olan piyoverdin, demiri bağlayan bir siderofordur. Bakterinin üremesi ve virülansı için anahtar rol oynar. Yaklaşık olarak 1500 dalton molekül ağırlığındadır. Suda erir bir demir şelatörü olan piyoverdinin *P. aeruginosa*'da yapısal olarak üç farklı tipi tanımlanmıştır. Bu pigment ETA ve diğer virülans faktörlerinin salınımını da düzenlemektedir [20;22].

2.2.3.6. Elastaz

Elastini sinerjistik olarak indirgeyen iki enzim olan LasA(serin proteaz) ve LasB(çinko metalloproteaz), akciğer parankim dokusu ve diğer elastin içeren dokulardaki hasarla ve yaygın *P. aeruginosa* infeksiyonu sonucu oluşan hemorajik lezyonlarla(ektima gangrenozum) ilişkilidir. Bu iki enzim kompleman bileşenlerini indirgeyerek, nötrofil kemotaksis ve fonksiyonlarını inhibe ederek akut infeksiyonlarda doku hasarına neden olur. Kronik *Pseudomonas* infeksiyonları infekte dokuda immün kompleks birikimi ile birlikte, LasA ve LasB'ye karşı antikor oluşumu ile karakterizedir [22].

2.2.3.7. Alkalın proteaz

Elastaza benzer şekilde doku hasarına ve infeksiyonun yayılmasına neden olur. Konak bağışık yanıtına da etkilidir [22].

2.2.3.8. Fosfolipaz C

Isıya duyarlı bir hemolizin olan fosfolipaz C, lipid ve lesitin bağlarını kırarak doku hasarını kolaylaştırır. Sitoplazmik membranı ve pulmoner surfaktanı hasara uğratar, opsoninleri inaktive eder. Hemolizin üretimi ile solunum yolu infeksiyonları ve idrar yolu infeksiyonları arasında bir ilişki gösterilmiştir ancak, fosfolipaz C'nin bu infeksiyonlardaki rolü kesinlik kazanmamıştır [21;22].

2.2.3.9. Ekzoenzim S ve T

P. aeruginosa'nın ürettiği hücre dışı enzimleridir. ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahiptir. Protein sentezi inhibisyonu ile epitel hücrelerinde hasar, doku invazyonu ve nekrozu kolaylaştırıcı etkisi vardır [21;22].

2.2.3.10. Lökositin

Nötrofil ve lenfosit fonksiyonlarını inhibe eder [21].

2.2.3.11. Enterotoksin

Normal gastrointestinal aktiviteyi bozarak diyareye yol açar [21].

2.2.3.12. Quorum sensing

P. aeruginosa ürettiği ortamda açıl homoserin lakton molekülleri(AHLs) üretir. İntrasellüler ortamdaki bakteri sayısı ile orantılı olarak artan AHLs yeterli konsantrasyona ulaştığında, transkripsiyonel regülatörleri indükler. Böylece bakteri topluluğuna gen ekspresyon regülasyonunu topluluk olarak koordine edebilme fırsatı

sağlar. Quorum sensing olarak bilinen bu süreçte iki farklı sistem(las sistemi ve rhl sistemi) tanımlanmıştır.

Hücreden hücreye sinyal iletişim sistemi bakterilerin biyofilm oluşturabilmesi için de gereklidir. AHLs *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan kistik fibrozisli hastaların akciğerlerinde saptanmıştır. Bu sistemi hedefleyen terapötik bileşikler, bakterinin virölansını zayıflatmak suretiyle enfeksiyonun üstesinden gelebilmek adına gelecek için ümit vermektedir [20].

2.2.4. Klinik

2.2.4.1. Solunum yolu enfeksiyonları

Alt solunum yollarının *P. aeruginosa* enfeksiyonları asemptomatik kolonizasyondan, iyi huylu trakeobronşitten, ciddi nekrotizan pnömoniye kadar değişebilmektedir. Kistik fibrozisli hastalar, kronik akciğer hastaları ve nötropenili hastalarda kolonizasyon görülebilir. Kistik fibrozisli hastaların örneklerinden izole edilen mukoid kökenler birçok antibiyotiğe dirençli olduklarından eradikasyonları zordur. Bağışıklık sistemi bozulmuş hastaları *Pseudomonas* enfeksiyonlarına yatkın hale getiren koşullar; geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi sonucu normal floranın ortadan kalkması ve organizmayı alt solunum yollarına sunan mekanik solunum cihazlarının kullanılmasıdır. Bu tip hastalardaki invaziv hastalık bilateral akciğerlerde yaygın mikroapse oluşumu ve doku nekrozu oluşturan bronkopnömoni ile karakterizedir ve % 70'e varan mortaliteye sahiptir [22].

2.2.4.2. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

P. aeruginosa çok sayıdaki bakterinin dokulara yerleştiği durumlar dışında sağlıklı insanlarda nadiren hastalık oluşturur. Kontamine sulara(>10⁶ cfu/ml bakteri içeren) uzun süre maruz kalan kişilerde follikülit, parmak aralarını tutan sulu dermatit veya otitis eksterna gibi deri enfeksiyonları görülebilir. *P. aeruginosa*'ya bağlı follikülit makülopapüler veya vezikülopüstüler döküntü ile karakterize olup, genellikle kontamine yüzme havuzları ya da kaplıcalardan kaynaklanır. Kendi kendini sınırlayan enfeksiyonlar şeklinde olup, bazen topikal antibiyotik tedavisi, nadiren sistemik antibiyotik tedavisi gerektirebilir [20].

P. aeruginosa yüzeyel otitis eksternanın yaygın nedenleri arasındadır. Ayrıca kronik otitis media etkeni de olabilir ve diyabetik hastalarda invaziv otitis eksternaya neden olabilmektedir. İnvaziv otitis eksternada topikal antibiyotik tedavisi başarısız olup, dış kulak yolundaki erozyon ve kranial sinirlerin tutulumuna bağlı olarak enfeksiyonun mortalitesi % 20 civarındadır [20;22].

P. aeruginosa kornea için muhtemelen en tahrip edici bakteridir. Korneada ülserasyon, keratit, konjunktivit, endoftalmit ve orbital sellülit nedenidir. En yaygın enfeksiyon kaynağı kontakt lens solüsyonları, oküler girişimler ve kozmetik amaçlı kullanılan rimellerdir [20].

P. aeruginosa için en iyi tanımlanan deri enfeksiyonu yanık yaralarıdır. Ciddi yanığı olan hastalarda yaraların kolonizasyonu genellikle lokalize damar hasarı, doku nekrozu ve son olarak da bakteriyemi ile sonuçlanır. Yanık yüzeyinin nemli olması, yaraya nötrofilerin girişinin yetersiz olması, hastaları bu enfeksiyonlara yatkın hale getirir. En çok kullanılan topikal antipseudomonal ajan olan gümüş sülfadiazin, profilaktik olarak kullanıldığında çok etkilidir [20;22].

P. aeruginosa cerrahi yaralardan da en sık izole edilen etkenler arasındadır. Bu durum sıklıkla uygulanan cerrahinin büyüklüğü ve yeri ile ve altta yatan hastalık durumuyla ilişkilidir [20].

P. aeruginosa ayağa penetre olan bir hasar sonucu(örneğin; tırnak üzerine bası) gelişen osteokondritin de sık rastlanan etkenlerindendir. Diyabetik hastalarda ve intravenöz ilaç kullanımı durumlarında hematogen yayılım sonucu kronik osteomyelite neden olabilir, ancak nadiren septik artrite neden olur [20;22].

2.2.4.3. Üriner sistem enfeksiyonları

Anatomik bozukluklar ve spinal kord yaralanmaları dışında toplum kaynaklı *P. aeruginosa* 'nın etken olduğu idrar yolu enfeksiyonları nadir görülür. Enfeksiyonların büyük çoğunluğu nozokomiyal olup, hemen her zaman uzun süreli kateterizasyonun sonucunda oluşur. Primer odaktan hematogen yayılım nadirdir. Enfeksiyon genellikle kateterin çekilmesi ile veya diğer predispozan faktörlerin giderilmesi ile çözümlenir [20].

2.2.4.4. Bakteriyemi ve Endokardit

P. aeruginosa'nın neden olduğu bakteriyemi, diğerk Gram negatif bakteriyemilerden klinik olarak ayırt edilemez. *P. aeruginosa* bakteriyemisinin mortalitesi daha yüksektir. Çünkü bu mikroorganizma genellikle immün yetmezlikli, nötropenik, hematolojik malignensili, geniş yanıklı ve diabetli hastalarda daha sık bakteriyemi oluşturur. Virölansı da diğerk Gram negatif bakterilere oranla daha fazladır. *P. aeruginosa* bakteriyemisinin tüm bakteriyemiler arasındaki sıklığı çeşitli çalışmalarda % 5-20 arasında, mortalite oranları % 17-78 arasında değişmektedir. Bakteriyemili hastaların az bir kısmında karakteristik deri lezyonları(ektima gangrenozum) gelişebilir. Ektima gangrenozum hemorajik, nekrotik ve ülserelabilen eritematöz veziküller şeklinde kendini gösterir [20;22].

Primer olarak intravenöz ilaç bağımlılarında gözlenen *Pseudomonas* endokarditi nadirdir. İlaç bağımlılarının kullandıkları özel eşyalar ile bulaşma gerçekleşir. Sıklıkla trikuspit kapağın kronik tutulumuna neden olur [22].

2.2.4.5. Beyin omurilik sıvısı infeksiyonları

Santral sinir sisteminin *P. aeruginosa* ile infeksiyonu nadir görülür. Yenidoğanlarda, sinir cerrahisinde, transplantasyon hastalarında ve altta yatan kronik hastalık durumlarında risk fazladır. *P. aeruginosa* intrakraniyal apselerin çok az bir kısmından izole edilebilir. İnsidansı kronik otitis medialis ve mastoiditli hastalarda daha fazladır [20].

2.2.5. Antibiyotik Duyarlılığı

Enterobacteriaceae ile kıyaslandığında, *P. aeruginosa* nispeten pek çok antibiyotiğedirençlidir. Bununla birlikte semisentetik penisilinler, üreidopenisilinler, karboksipenisilinler, 3.kuşak sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar, aminoglikozidler, kinolonlar ve polimiksinler *P. aeruginosa* suşlarına karşı çok iyi aktivite gösteren antibiyotiklerdir [20].

P. aeruginosa infeksiyonları sıklıkla hayatı tehdit edecek derecede şiddetlidir ve sınırlı antibiyotik duyarlılığının yanı sıra tedavi sırasında kullanılan antibiyotiklere de direnç geliştirebilmesi tedaviyi zorlaştırmakta, böylece giderek artmakta olan

antibiyotik direnci problem oluşturmaktadır [1;23;24]. Antibiyotik direncinin yüksek düzeyde olmasının nedenlerinden birisi, dirençli mikroorganizmanın hastadan hastaya yayılmasıdır. Diğer bir neden, spesifik mikroorganizmanın antibiyotiklere maruz kaldıktan sonra direnç geliştirmesidir. İrrasyonel antibiyotik kullanımına bağlı ortaya çıkan direnç, toplum kökenli ve hastane kökenli infeksiyonların tedavisinde sorun yaratmaktadır [24].

Antibiyotik direnci bir bakterinin antimikrobiyal ajanın üremesini engelleyici veya öldürücü etkisinden korunabilme kapasitesidir. Bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmesinde doğal veya kazanılmış direnç mekanizmalarının yanı sıra, ortam ve koşullara bağlı direnç de etkilidir:

A. Doğal direnç: Bakterinin genetik özellikleri nedeniyle bazı antibiyotiklere dirençli olmasıdır. Doğal direnç mikroorganizmaların tür özelliği olarak antibiyotiğin hedeflediği yapıya sahip olmayışları veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefe ulaşamamasından kaynaklanır [25].

B. Kazanılmış direnç: Bakterinin genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak kromozom, transpozon veya plazmid DNA'sındaki mutasyonlar sonucunda veya direnç genlerinin transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla başka bakterilerden alınması ile ortaya çıkan dirençtir [25;26].

-Kromozoma Bağlı Direnç: Spontan mutasyonlar sonucunda bakteri hücresinde meydana gelen yapısal değişiklikler ile hücrelerin ilaca geçirgenliğinde değişme ve hücre içinde ilacın hedeflediği yapılarda değişiklikler oluşabilir [25].

-Plazmidlere Bağlı Direnç: Kromozomdan bağımsız olarak replike olabilen plazmidler, klinikte gözlenen direncin çoğundan sorumludur. Direnç plazmidleri (R plazmid) farklı antibiyotiklere karşı direnç genleri taşırlar. R plazmidi içeren bakteriler direnç özelliklerini diğer duyarlı bakterilere aktarabilirler. Bu durumda duyarlı bakteriler de dirençli hale gelir. Bu tip dirençte daha çok antibiyotikleri inaktive eden veya hücre zarı permeabilitesini değiştiren enzimler rol oynamaktadır [25].

-Transpozonlara Bağlı Direnç: Sıçrayıcı DNA dizileri olan transpozonlar, plazmidlerden farklı olarak, kromozomdan bağımsız replike olamazlar. Bu nedenle kromozom veya plazmidin yapısında yer alarak, bunlar arasında yer değiştirebilmektedirler [25].

C. Ortam ve Koşullara Bağlı Direnç: Antibiyotiklerin in vitro ve in vivo etkinliklerinin farklılık göstermesine neden olan dirençtir. Antibiyotiklerin infeksiyon bölgesine ulaşamaması, dokuların oksijenlenme farkları ve dokulardaki pH

değişiklikleri gibi nedenlerle in vitro olarak etkili bulunan antibiyotik in vivo koşullarda etkili olmayabilir [26].

P. aeruginosa antistafilokokal penisilinler, ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, ampisilin/sulbaktam, trimetoprim/sulfametoksazol, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, 3. kuşak sefalosporinlerden sefotaksim ve seftriaksona doğal olarak dirençlidir [10].

P. aeruginosa genetik olarak birçok antibiyotiğe doğal dirençli olmasının yanı sıra klinikte hastalara uygulanan antibiyotik tedavisi sırasında da çeşitli direnç mekanizmalarıyla antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir. Kromozomal ve plazmid kaynaklı beta-laktamazların üretimi, antibiyotik hedeflerinde değişiklik, porin proteinlerindeki değişiklik sonucu dış membran geçirgenliğinin azalması, efluks pompa sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılması başlıca direnç mekanizmalarıdır [11].

2.3. Efluks Pompa Sistemi

Çoklu ilaca dirençli(MDR) *P. aeruginosa* izolatları için efluks pompa sistemi bakteri hücrelerinde antimikrobiyal ilaçların birikmesini ve aktivitesi için yeterli konsantrasyona ulaşmasını önleyen, yaygın bir direnç biçimidir. Efluks pompa sistemi sıklıkla dış membran geçirgenliğinde azalma ile birlikte çalışarak beta laktam antibiyotikler, florokinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, trimetoprim/sulfametoksazol ve aminoglikozidlere direnç oluşumunu sağlar [27;28].

P. aeruginosa dahil tüm Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısında dış membran, periplazmik aralık ve sitoplazmik membran bulunur. *P. aeruginosa*'nın efluks pompa sistemi yapısal ve fonksiyonel olarak birbirine bağımlı 3 proteinden oluşmaktadır. Enerji bağımlı pompa sitoplazmik membranda(örneğin; MexB), porin proteini dış membranda(örneğin; OprM) ve bu ikisi arasındaki periplazmik aralıkta üçüncü bir protein(örneğin MexA) yer almaktadır[27].

Dört major efluks pompa sistemi(MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN) *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direncine önemli oranda katkıda bulunmaktadır. MexAB-OprM sisteminde, MexA periplazmik bağlayıcı proteini, MexB sitoplazmik proteini ve OprM ise dış membran kanalını tanımlar. Bu tanımlar diğer efluks pompa sistemlerinde de aynı sıralama ile geçerlidir. Bunlardan MexAB-OprM ve MexXY-OprM pompaları intrinsik çoklu dirence katkıda bulunmaktadır. MexXY-OprM veya MexCD-OprJ pompaları ise kazanılmış dirençle ilişkili bulunmuştur[27-30].

Efluks pompa sistemi çoğul direnç genine sahip fenotipler oluşturur. MexAB-OprM efluks pompa sistemi imipenem hariç tüm betalaktamlara ve kinolonlara direnç oluşturması ile önemlidir. MexCD-OprJ efluks pompa sistemi 4. kuşak sefalosporinlere direnç oluşturur. MexEF-OprN aktif pompalama sistemi karbapenemlere dirence neden olabilir [9;16;28-32]. *P. aeruginosa*' da bulunan efluks pompa sistemleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

2.4. Dış Membran Porin Defektleri

Dış membranın Gram negatif bakterilerde intrinsik(doğal) dirence katkısı büyüktür. Dar porin proteinleri nedeniyle etkili bir bariyer oluşturarak, hidrofilik maddelerin ve düşük akışkanlıktaki lipopolisakkaridlerin permeabilitesini ve lipofilik maddelerin hücre içine difüzyonunu kısıtlar. Bununla birlikte *P. aeruginosa* gibi son derece düşük permeabilite gösteren bakterilerde dahi pek çok antibiyotiğin periplazmik konsantrasyonu, dış konsantrasyonun % 50'sine kadar ulaşabilmektedir. Bu nedenle dış membran bariyeri geniş intrinsik direnci tek başına açıklayamaz, beta-laktamazların üretimi ve efluks pompa sistemi ile kombine bir intrinsik direnç söz konusudur [16;30-34]

Tablo 2. *P. aeruginosa*' da bulunan efluks pompa sistemleri[33]

Sistem	Düzenleyici gen	Mutasyon geni	Substratlar
MexAB-OprM	mexR	nalB ve nalC	İmipenem hariç beta laktam antibiyotikler , kloramfenikol, eritromisin, florokinolonlar, tetrasiklin, trimethoprim, sulfonamid, novobiosin, akriflavin, etidyum bromid, sodyum dodesil sülfat, aromatik hidrokarbonlar, triklosan, irgasan, homoserin lakton.
MexCD-OprJ	nfxB	nfxB	İmipenem hariç beta laktam antibiyotikler , kloramfenikol, eritromisin, florokinolonlar, tetrasiklin, trimethoprim, sulfonamid, novobiosin, akriflavin, sodyum dodesil sülfat, aromatik hidrokarbonlar, triklosan.
MexEF-OprN	mexT	nfxC	Kloramfenikol, florokinolonlar, trimethoprim, aromatik hidrokarbonlar, triklosan.
MexXY-OprM	mexZ		Aminoglikozidler, karbenisilin, seftazidim ve imipenem hariç beta laktamlar, kloramfenikol, eritromisin, florokinolonlar, tetrasiklin, novobiosin

P. aeruginosa dış membranındaki asıl porin proteini OprF'dir. Diğer yardımcı porin proteinleri OprB, OprC, OprD, OprE şeklindedir. *P. aeruginosa* infeksiyonlarının antimikrobiyal ilaçlarla tedavisinde OprD porin proteini(eski literatürlerde OprD2) kaybı sonucu karbapenem direnci gelişmekte olup, imipeneme direnç gelişirken meropeneme ise duyarlılıkta azalma görülmektedir. Bu durum meropenemin farklı kanallardan dış membranı geçebildiğini göstermektedir. Ayrıca OprD porin proteini kaybına bağlı olarak karbapenem direnci gelişimi sadece kromozomal AmpC tipi beta-laktamaz üreten suşlarda görülmekte olup, bu iki direnç mekanizması arasında yakın ilişki olduğunu düşündürmektedir [16;30-34].

2.5. Aminoglikozid Direnci

Pseudomonaslarda aminoglikozid direnci ile ilgili çeşitli direnç mekanizmaları saptanmıştır. En önemli mekanizma bakteriyel aminoglikozid fosforiltransferaz, aminoglikozid asetiltransferaz, aminoglikozid adeniltransferaz enzimleri ile aminoglikozidlerin modifikasyonudur. Dış membran permeabilitesindeki değişiklikler ve aktif efluks pompa sistemi diğer önemli aminoglikozid direnç mekanizmalarıdır. Daha nadir olarak ribozomal hedeflerdeki değişiklikler(16S rRNA'nın metilasyonu) ve kromozomal kaynaklı aphA gen mutasyonları da aminoglikozid direncine neden olmaktadır [9;29;33].

2.6. Florokinolon Direnci

P. aeruginosa'da florokinolon direncine iki major mekanizma yol açar: İlk mekanizma enzimler üzerindeki yapısal değişikliklerdir. DNA giraz(Topoizomeraz II) enzimindeki aktif bölgeyi kodlayan gyrA/gyrB genlerinde oluşan nokta mutasyonlar sonucunda enzimin A ve B subünitlerinin aminoasit dizilimleri değişerek, enzimin kinolonlara olan affinitesi azalır. Florokinolonların diğer hedefi olan topoizomeraz IV enzimini kodlayan parE ve parC genlerindeki nokta mutasyonlar da dirence yol açmaktadır. İkinci önemli mekanizma aktif efluks pompa sistemi ile gelişen dirençtir. Bu mekanizma ile bakteri florokinolonların yanı sıra tetrasiklinler, kloramfenikol ve eritromisine de direnç gösterir [35-37].

2.7. Beta-Laktamaz Enzimlerine Bağlı Direnç

Gram negatif bakterilerde Penisiloin-serin transferaz(genellikle beta-laktamaz olarak adlandırılır) enzimleri periplazmik aralıkta bulunur. Sentezlenmeleri kromozom veya plazmid kontrolündedir. Beta-laktamaz enzimleri beta laktam halkasındaki amid bağını parçalar, sonuçta ortaya çıkan ürün antibakteriyel aktivitesini kaybeder. *P. aeruginosa*'da beta laktam antibiyotiklere direnç için en önemli kazanılmış direnç mekanizması beta-laktamaz üretimidir [14;38;39].

Beta-laktamazların sınıflandırılması 1970 yılında Jack ve Richmond tarafından ilk kez gündeme getirilmiş olup, 1973'te Richmond ve Sykes tarafından ilk sınıflama yapılmıştır. Bush tarafından 1989 yılında, sınıflandırmadaki eksiklikler giderilmiş ve 1995'te güncellenmiştir. Revize edilmiş Bush sınıflaması substrat özgüllüğünü ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılığı esas alan fenotipik bir sınıflandırmadır. Bu fenotipik sınıflandırmanın en büyük dezavantajı substrat özgüllüğünün ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılığın nokta mutasyonlar nedeniyle büyük oranda değişebilmesidir [40-44].

Ambler tarafından 1980 yılında yapılan beta-laktamaz enzimlerinin moleküler sınıflandırması ise mutasyonlardan etkilenmemektedir. Sekans esaslı bu sınıflandırma A'dan D'ye dört sınıfı içeren kolay anlaşılır bir sınıflandırmadır. Moleküler sınıflandırmada A, C ve D sınıfı enzimlerin aktif bölgelerinde serin bulunurken, B sınıfı enzimler aktiviteleri için çinko iyonlarına gereksinim duyarlar. *P. aeruginosa*' da bu dört sınıf beta-laktamazların çoğu bulunmaktadır [14;33;43-45]. Beta-laktamazların sınıflandırılması Tablo 3'te gösterilmiştir.

2.7.1. Kromozomal Kökenli Beta-Laktamazlar

2.7.1.1. AmpC Tipi İndüklenebilir Beta-Laktamaz Enzimleri(İBL)

Doğal olarak kromozomda *ampC* geninde kodlanmış olan bu grup enzimler *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Yersinia* ve *Hafnia* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinin yanı sıra; *Pseudomonas*larda da bulunmaktadır. Bu grup enzimler beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmazlar, genellikle oksiminosefalosporinlere(sefotaksim ve seftriakson) ve sefamisinlere dirençlidirler.

Ambler sınıflandırmasında sınıf C'de ve fonksiyonel sınıflandırmada grup 1'de yer alırlar.

Tablo 3. Beta- laktamazların sınıflandırılması[46]

Fonksiyonel mekanizma	Ambler (sınıf)	Bush (grup)	Örnekler	Substratlar
Serin beta-laktamazlar	Sınıf A penisilinazlar	(2a,2b,2c)	Geniş spektrumlu beta-laktamazlar: TEM-1, TEM-2,SHV-1	Benzilpenisilin, aminopenisilinler, karboksipenisilinler, dar spektrumlu sefalosporinler (sefazolin, sefuroksim)
		(2be)	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar(GSBL): TEM ailesi ve SHV ailesi	Geniş spektrumlu beta-laktamazların substratlarına ilaveten kloksasilin, metisilin ve oksasilin
			Diğerleri: BES-1,GES/IBC ailesi, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1/2	TEM ve SHV ailesi ile aynı
		(2br)	TEM ailesi (TEM-30, TEM-31)	TEM ve SHV ailesi ile aynı ve inhibitörlere dirençli
		(2e)	CTX ailesi	Geniş spektrumlu beta-laktamazlar ile aynı, bazı enzimler için sefepim
		(2f)	Karbapenemazlar(KPC-1, KPC-2, KPC-3 ve GES-1, GES-2)	Geniş spektrumlu beta-laktamazların substratlarına ilaveten karbapenemler, sefamisinler
Metallo-beta-laktamazlar	Sınıf B metallo-beta-laktamaz(Çinko)	(3a, 3b, 3c)	Karbapenemazlar: IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2, GIM-1 ve L-1, CcrA	Karbapenemaz sınıf A ile aynı
Serin beta-laktamazlar	Sınıf C sefalosporinaz	(1)	AmpC tip: AAC-1, ACT-1, CFE-1, CMY ailesi, DHA-1, DHA-2, FOX ailesi, LAT ailesi, MIR-1, MOX-1 ve MOX-2	Geniş spektrumlu beta-laktamazların substratlarına ilaveten sefamisinler
Serin beta-laktamazlar	Sınıf D kloksasilin hidrolize edici enzimler(OXA)	(2d)	OXA ailesinin çoğu	Geniş spektrumlu beta-laktamazların substratlarına ilaveten kloksasilin, metisilin, oksasilin.
			Diğer OXA: OXA-23, OXA-27, OXA-40, OXA-48	IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2 ve GIM-1 ile aynı
Bilinmiyor		(4)	AVS-1	Herhangi bir moleküler veya fonksiyonel gruba uymayan, sekanslanamamış ya da özellikleri tanımlanamamış enzimler

Kromozomal AmpC tipi beta-laktamazların üretiminden sorumlu birkaç gen vardır. Bunlardan *ampR* pozitif transkripsiyonel düzenleyici gen (aktivatör-baskılayıcı) olup esas indüksiyondan sorumludur. *AmpG* geni ise indüksiyonla ilgili sinyal üretiminde görev alan bir transmembran proteinini kodlar. Üçüncü gen *ampD*, indüksiyonu baskılayıcı özellikte bir proteini kodlar. Dördüncü gen *ampE*, indüksiyon

için gerekli bir sitoplazmik membran proteinini kodlar. AmpC tipi beta-laktamazlar normalde düşük miktarda ekspresse edilirken, bazı beta laktam antibiyotikler ile(özellikle imipenem) karşılaştıklarında üretimleri 100 ile 1000 kat artar. Bu sayede yüksek düzeyde beta-laktamaz üretebilen dereprese mutantlar seleksiyona uğrar. *P. aeruginosa* doğal olarak seftazidime, aztreonama, karboksipenisilinlere duyarlı iken en sık bu mekanizma ile 3. kuşak sefalosporinlerin tümüne direnç kazanabilir. Geniş spektrumlu sefalosporinlerin veya aztreonamın İBL sentezlediği bilinen bakteriler ile gelişen infeksiyonlarda monoterapide kullanılması dereprese mutantların seleksiyonuna yol açmaktadır. İBL üretimi laboratuvar tarafından belirtilmemiş olsa bile, *P. aeruginosa* izolatlarının bu özellikte olduğu dikkate alınmalıdır. *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisi sırasında, kullanılan antimikrobiyal ilaca direnç gelişebileceğinden bu suşların antibiyogramlarının 3-4 günlük tedaviden sonra tekrarlanması önerilmektedir [33;47-50].

Karbapenemler İBL sentezleyebilen *P. aeruginosa* suşlarında indükleyici etki yaparlar, fakat dereprese mutantlara bakterisidal etkili oldukları için seleksiyona yol açmazlar [47-50].

Kromozomal AmpC beta-laktamaz genlerinin plazmidlere aktarılması ile plazmid kökenli AmpC tipi enzimler de ortaya çıkmıştır. Bu tip enzimler indüklenebilir özelliklerinin olmayışı ile kromozomal kökenli olanlardan ayrılırlar. Plazmid kökenli AmpC tipi enzimlerin bir kısmı kromozomal olanlarla çakışmakta ise de çoğunluğu farklıdır. Başlıca plazmid kökenli AmpC tipi enzimler; BIL-1, CMY-1, CMY-2, CMY-3, FOX-1, LAT-1, MIR-1 ve MOX-1 olup, bu enzimler *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında yaygındır. *Enterobacteriaceae*'dan farklı olarak *P. aeruginosa* izolatlarında plazmidle ilişkili sefalosporinazlar bulunamamıştır. Ancak plazmidlerce kodlanmış bazı sefalosporinaz enzimlerinin Pseudomonal AmpC tipi beta-laktamazlarla yapısal benzerliği dikkat çekicidir[14;33]. Kromozomal beta-laktamaz enzimlerinin çoğunluğu moleküler sınıf C'de yer alır fakat sınıf A ve sınıf B içinde de bulunabilirler. Farklı substratlara olan etkilerine göre Bush sınıflandırmasında grup 2b, 2be, 2e ve grup 3 içerisinde yer alırlar [44;50].

2.7.2. Plazmid Kökenli Beta-Laktamazlar

Plazmid kökenli beta-laktamazlar Ambler moleküler sınıflandırmasının dört sınıfında da yer almaktadır. En yaygın olanları TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleridir.

Moleküler sınıf A ve fonksiyonel grup 2b içinde yer alırlar. Klavulanik asit ile inhibe olan bu enzimlerden başka, nokta mutasyonlar sonucu oluşan ve TEM ile SHV enzimlerinden köken alan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar(GSBL)'lar da vardır [44;50;51].

2.7.3. Sınıf A Karbenisilin Hidrolize Eden Beta-Laktamazlar

P. aeruginosa'da karbenisilini hidrolize eden dört çeşit *Pseudomonas* spesifik enzim tipi tanımlanmıştır. Bunlar: PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 ve CARB-4. Karboksipenisilinler, üreidopenisilinler ve sefsulodin bu enzimlerin etkiledikleri substratlardır. Moleküler sınıf A ve fonksiyonel grup 2c'de yer alırlar. PSE-1, PSE-4 ve CARB-3 birbirleriyle yakın ilişkili(sadece 1 ya da 2 aminoasit farklı) enzimlerdir. Ancak bu üç enzim CARB-4 ile sadece % 86,3 oranında DNA homolojisi gösterirler. Karbenisilnaz üreten suşların sefepim, sefpirom ve aztreonama duyarlılıkları değişken olup; seftazidim ve karbapenemlere % 100 duyarlıdırlar [33;44].

2.7.4. Sınıf A Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar(GSBL)

Moleküler sınıf A ve fonksiyonel grup 2b'de yer alan GSBL enzimleri PSE enzimlerinden farklı olarak, sadece karboksipenisilinlere ve üreidopenisilinlere değil; aynı zamanda geniş spektrumlu sefalosporinlere(seftazidim, sefepim, sefpirom) ve aztreonama da direnç gelişimine yol açarlar. Karbapenemlere affiniteleri düşüktür. Klavulanik asit ve tazobaktam ile aktiviteleri inhibe edilebilir [43;47;52].

Klinik *P. aeruginosa* izolatlarında GSBL'lar, 1990 yılından sonra saptanmaya başlamıştır. *Enterobacteriaceae* ailesinde iyi tanımlanmış olan TEM ve SHV tipi enzimlerin dışında, *P. aeruginosa*'da başka enzimler de tanımlanmıştır: PER(çoğunlukla Türkiye'den), VEB(Güneydoğu Asya, Fransa ve Bulgaristan), GES/IBC(Fransa, Yunanistan ve Güney Asya) ve BEL enzimleri(bkz. Tablo 3). Bu enzimlerin hidrolize edici etkileri birbirlerine benzer olsa da, genetik düzeydeki benzerlikleri düşüktür [33]. *P. aeruginosa*'nın ürettiği GSBL enzimleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

TEM ve SHV tipi GSBL enzimlerine ait genler muhtemelen gen transferi yoluyla *Enterobacteriaceae* ailesine üye bakterilerden, *P. aeruginosa*'ya aktarılmıştır. *P. aeruginosa* için tam olarak tanımlanmış ilk GSBL enzimi olan PER-1 Fransa'da

1991 yılında bir Türk hastanın idrar izolatında kromozoma kodlanmış olarak bulunmuştur. Daha sonra plazmide kodlanmış PER-1 enzimleri bildirilmiş olup, bugün için Türkiye'deki nozokomiyal *P. aeruginosa* suşları arasında çok yaygındır. Ayrıca Belçika, Polonya ve İtalya'da da bu enzimi üreten suşlar bulunmuştur. PER-1 klasik GSBL'ler ile aynı substrat profilini sergilemekle birlikte, beta-laktamaz inhibitörleri ve imipenem ile bir dereceye kadar inhibe edilebilmektedir [33;47;52;53].

Tablo 4. *P. aeruginosa*'nın ürettiği GSBL enzimleri[33]

Enzim	Gen lokalizasyonu	İlk izolasyon	Diğer izolasyonları
SHV-2a	C, P	1995 Fransa	Tayland, Polonya
SHV-5	P	1994–1996 Tayland	Yunanistan
SHV-12	C	1994–1996 Tayland	Yunanistan
TEM-4	P, C	1996 Fransa	
TEM-21	C	1997 Fransa	
TEM-24	P	1998 Fransa	
TEM-42	P	1992 Fransa	
TEM-116	Bilinmiyor	2004-2006 Fransa	
VEB-1	C, P, I	1998 Fransa	Tayland, Hindistan, Çin, Bulgaristan
VEB-1a	C, I	1999 Küveyt	Hindistan
VEB-1b	C, I	1999 Küveyt	
VEB-2	C, I	1999 Tayland	
PER-1	C	1991 Fransa	Türkiye, İtalya, Belçika, Polonya
GES-1	P, I	1999 Fransa	Brezilya
GES-2	P, I	2000 Güney Afrika	
GES-5	P, I	2004 Fransa	Güney Afrika
GES-9	P, I	2004 Fransa	
GES-8(IBC-2)	C, I	1999 Yunanistan	
BEL-1	C, I	2004 Belçika	

C:Kromozomal, I:İntegron Kaynaklı, P:Plazmid kaynaklı

Diğer bir moleküler sınıf A GSBL enzimi ise VEB enzimi olup, bu gruptan VEB-1 ilk olarak 1998'de Fransa'da izole edilmiştir. VEB enzimlerinin substrat profilleri de tıpkı PER enzimleri gibidir [52].

20. yy biterken yeni bir enzim olan GES(Guiana extended spectrum) Fransız Guiana'sında tanımlanmış ve izole edildiği bölgeye göre adlandırılmıştır. GES-1 ve GES-2 enzimleri sırasıyla Fransa, Brezilya ve Güney Afrika'da bulunmuştur. GES-1 enzimi olağandışı olarak düşük katalitik aktiviteye sahiptir ve pek çok substrata affinitesi düşüktür. Yine olağandışı olarak inhibisyon profiline klavulanik asit ve imipenem dahildir. Çoğu sınıf A GSBL'den farklı olarak GES-1 ikinci kuşak sefalosporin olan sefoksitine güçlü affinite gösterir. 2000 yılında keşfedilen GES-2 ise GES-1'den 100 kat daha fazla karbapenemaz aktivitesine sahiptir, fakat bu aktivite bile

moleküler sınıf B’de yer alan metallo enzimlerin karbapenemaz aktivitesine göre çok daha düşüktür. GES enzimlerinin yeni varyantları olan GES-5, GES-8 ve GES-9’un aktiviteleri klavulanik asit, tazobaktam ve imipenemle baskılanabilmektedir [33;52].

BEL-1 enzimi yakın zamanlarda Belçika’da bulunmuş yeni bir Ambler sınıf A GSBL enzimidir. Geniş spektrumlu sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilen bu enzimin aktivitesi tazobaktam, klavulanik asit, sefoksitin, moksolaktam ve imipenemle baskılanabilmektedir [33].

Sınıf A GSBL’leri kodlayan genlerin yayılması, antibiyotik direncinin yayılmasında önemli rol oynayarak; hayatı tehdit edebilen *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisindeki antibiyotik seçeneklerini kısıtlamaktadır. Bu yayılda plazmidler ve integronlar önemli rol oynamaktadır. *P. aeruginosa*’daki TEM ve SHV enzimlerini kodlayan genlerin çoğunun plazmid lokalizasyonları gösterilmiştir. GSBL enzimlerini kodlayan genlerin eş zamanlı olarak hem kromozomda hem de plazmidlerde saptanmış olması, transpozonların bu gen mobilizasyonundaki önemini göstermektedir [33;52].

2.7.5. Sınıf D Beta-Laktamazlar(Oksasilinazlar)

OXA tip enzimler moleküler sınıf D ve fonksiyonel sınıf 2b’de yer alırlar. Klasik OXA enzimleri (OXA-1, OXA-2, OXA-10) karboksipenisilinlere ve üreidopenisilinlere dirence neden olurken, seftazidime direnç oluşturmazlar. Seftazidimi hidrolize eden genişlemiş spektrumlu oksasilinazlar klinik yönden büyük öneme sahiptir. Etki spektrumları sefotaksim, sefepim, sefpirom, aztreonam ve moksolaktamı da kapsar. OXA-18 hariç diğerlerinin aktiviteleri beta-laktamaz inhibitörleri ile baskılanmaz. Bu durum rutin laboratuvar uygulamalarında identifikasyonlarını zorlaştırır. Sınıf D genişlemiş spektrumlu oksasilinazların çoğu Türkiye’deki klinik izolatlarda bulunmuştur. Bunlardan OXA-11, 14, 15, 16 enzimleri seftazidime dirence yol açar. OXA-31 ise sefepim direncine neden olur, fakat seftazidime etkisizdir [43;50;54;55].

2003 yılında ABD’de, MDR bir *P. aeruginosa* klinik izolatında yeni bir D sınıfı GSBL olarak OXA-45 enzimi bulunmuştur. Bu enzimin substrat profili OXA-18 ile benzer olup, aktivitesi klavulanik asitle baskılanabilmektedir [56].

Genişlemiş spektrumlu oksasilinazların çoğu plazmid veya integronlardaki genlerde kodlanmıştır. Bu durum direncin kolayca yayılmasına ve bu enzimleri üretebilen izolatlarının prevalansının artmasına neden olmaktadır [33;47].

2.7.6. Karbapenemazlar

Kromozomal kaynaklı veya kazanılmış enzimler olan karbapenemazlar; Ambler moleküler sınıflandırmasında A, B ve D sınıflarında yer alırlar. Moleküler sınıf A karbapenemaz(KPC-1, KPC-2, KPC-3 ve GES-1, GES-2) enzimleri aktif bölgelerinde serin içerirler ve aktiviteleri klavulanik asit ile baskılanır. Moleküler sınıf B karbapenemazların(IMP ailesi, VIM ailesi, SPM-1, SPM-2, GIM-1 ve L-1, CcrA) aktif bölgesi iki değerlikli çinko iyonu içerir ve metallo-beta-laktamaz(MBL) olarak adlandırılır. MBL'lar klasik beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli olup iki değerlikli metal şelatörlere duyarlıdırlar. Moleküler sınıf D karbapenemazlar(OXA-23, OXA-27, OXA-40, OXA-48) aktif bölgelerinde sınıf A'da olduğu gibi serin içerirler, ancak beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılıkları daha düşüktür. Karbapenemlerin tedavide yoğun olarak kullanılmasına paralel olarak son yıllarda karbapenemaz enzimi bildirimleri artmaktadır [43;47;57-59].

2.7.6.1. Sınıf B Metallo-Beta-Laktamazlar

Klinik yönden en önemli karbapenemazlardır. Karbapenemaz üretimi karbapenemlerin yanı sıra tüm beta laktam antibiyotiklere direnci de içermektedir. Sadece monobaktamlar MBL'ların hidrolitik özelliklerinden etkilenmezler. Moleküler sınıf B MBL enzimleri fonksiyonel sınıf 3a, 3b, 3c'de yer alır. IMP, VIM, SPM ve GIM tipi MBL'lar *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır. İlk MBL enzimi 1960 yılında *Bacillus cereus*'ta bulunmuş, daha sonra enzim *Stenotrophomonas maltophilia*'da da gösterilmiştir. IMP-1(Imipenemase) enzimi Japonya'da 1992-1994 yılları arasında, karbapenem dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatlarında gösterilmiştir. Önceleri sadece kromozomal olarak kodlandığı düşünülen bu enzimin *blaIMP-1* geninin plazmid ve integrone yerleşik olduğu saptanmış ve direncin aktarılabilir olması nedeniyle kaygılara yol açmıştır. 2000-2001 yılları arasında diğer IMP varyantları dünya genelinde çeşitli Gram negatif bakterilerde tanımlanmıştır. *blaIMP-7* Kanada'da(2002 yılında) ve Singapur'da(2004 yılında), *blaIMP-9* Çin'de(2006 yılında), *blaIMP-13* İtalya'da(2005 yılında) klinik *P. aeruginosa* izolatlarında bulunmuştur. Brezilya'da 2004 yılında bir *P. aeruginosa* suşunda bulunan IMP-16 MBL enzimini kodlayan gen kromozomda class 1 integronda kodlanmış olup, bu integronda aynı zamanda aminoglikozid modifiye edici

enzimleri kodlayan genlerin de yer aldığı gösterilmiştir. IMP-18 MBL enzimi ise ABD’de 2006 yılında izole edilen bir *P. aeruginosa* suşunda bulunmuştur. [60-66].

IMP tipi MBL üreten bakteriler önemli bir tehlike olarak görülmektedir. IMP-1 enzimini kodlayan *blaIMP-1* geni pozitif olan *P. aeruginosa* suşlarıyla yapılan bir çalışmadaki enfeksiyona bağılı ölüm oranı, *blaIMP-1* negatif izolatların enfeksiyonlarına göre anlamlı derecede daha yüksek olarak bulunmuştur [67].

İlk olarak İtalya’da 1997 yılında nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatında bulunmuş olan VIM-1(Veronese imipenemase) MBL enzimi kazanılmış MBL olan VIM ailesinin ilk temsilcisidir. Daha sonra aynı enzim İtalya ve Fransa’da 2004-2005 yıllarında *P. aeruginosa* izolatlarında saptanmıştır. Tıpkı *blaIMP* geni gibi *blaVIM-1* geni de class 1 integrondaki gen kasetinde aminoglikozid direncini kodlayan genlerle birlikte yer almaktadır. VIM-1 enziminin IMP ailesi ile % 30’dan daha az aminoasit özdeşliği olmasına karşın, genişlemiş spektrumlu hidrolitik etkisi aynıdır. Farklı metallo-beta-laktamaz enzimlerinin etki spektrumlarının aynı denecek derecede benzer olması ortak $\alpha\beta\alpha$ katlantı yapısına sahip olmaları ve aktif bölge yapılarının süperimpoze olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca aminoasit yapılarının çok benzer olduğu durumlarda bile enzimin substrata olan ilgisi(K_m değeri) değişebilmekte ve etki spektrumlarında farklılıklara yol açabilmektedir. Bunun en tipik örneği VIM-1 ve VIM-2 enzimleridir [68-72].

P. aeruginosa’da VIM-2 şu an dünyada en yaygın olan MBL enzimidir. Bu yaygınlık *blaVIM-2* geninin lokalizasyonu ile ilişkili olup, *blaVIM-2* allelinin mobil gen kasetleri ile taşındığı gösterilmiştir. İntegrona yerleşmiş olan direnç genleri yayılım potansiyeline sahiptir ve çeşitli class 1 integronlar transpozonların yapısında bulunmuştur. Bu durum integronlara yer değiştirme olanağı sağlayarak, çeşitli bakteri türleri arasında VIM-2 enziminin yayılması riskini gündeme getirmektedir [33].

VIM-3 metalloenzimi Tayvan’da 2001 yılında ilk kez izole edilmiş olup, *blaVIM-3* kromozomal bir gendir. Bundan sonrada *P. aeruginosa* izolatlarında VIM tipi MBL enzimleri(VIM-4, VIM-5, VIM-7, VIM-8, VIM-11, VIM-13, VIM-16) bulunmuştur [33]. Bu enzimlerin yayılım yerleri ve özellikleri Tablo 5’te verilmiştir.

2002 yılında Brezilya’da plazmide yerleşik *blaSPM-1* geni bulunmuş olup, bu geni taşıyan izolatın kolistin dışında Gram negatif bakterilere etkili tüm antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir. SPM-1(Sao Paulo MBL) enzimi IMP ve VIM ailesinden anlamlı oranda yapısal farklılık göstermektedir(IMP-1 ile sadece % 35’lik aminoasit

homolojisi) ve *bla*SPM-1 geni transpozon veya integronlar içinde yer almayıp sadece plazmidde bulunmaktadır [73].

Tablo 5. *P. aeruginosa*'da bulunan MBL enzimleri[33]

Enzim	Coğrafik yayılım	Kodlayıcı gen yerleşimi
IMP tipi enzimler		Plazmid veya kromozomlardaki integronlar
IMP-1	Japonya	
IMP-7	Singapur	
IMP-9	Kanada, Singapur	
IMP-13	Çin	
IMP-16	İtalya	
IMP-18	Brezilya, ABD	
VIM tipi enzimler		Plazmid veya kromozomlardaki integronlar
VIM-1	İtalya, Fransa, Yunanistan	
VIM-2	Fransa, İtalya, Yunanistan, İspanya, Almanya, Portekiz, Polonya, Rusya, İrlanda, Türkiye, Venezuela, Kore, Japonya, Çin, Suudi Arabistan, Hindistan, ABD, Kolombiya, Kanada	
VIM-3	Taylan	
VIM-4	Yunanistan, Macaristan, Polonya, İsveç	
VIM-5	Türkiye	
VIM-7	ABD	
VIM-8	Kolombiya	
VIM-11	Arjantin, İtalya	
VIM-13	İspanya	
VIM-15	Bulgaristan	
VIM-16	Almanya	
SPM-1	Brezilya	Plazmid
GIM-1	Almanya	Plazmid ve integron

Yine 2002 yılında diğer bir MBL enzimi alt sınıfı olan GIM-1(German imipenemase) enzimi Almanya'da bulunmuştur. GIM-1 diğer üç alt sınıftan farklı yapısal özelliktedir(% 28-43 aminoasit homolojisi). Plazmide veya class 1 integrona yerleşebilen bu enzim aztreonamı ve serin beta-laktamaz inhibitörlerini hidrolize edemez [74].

Geniş spektrumlu sefalosporinlerin veya karbapenemlerin yaygın kullanımı MBL enzimini kodlayan genlerin yayılmasını kolaylaştırmaktadır. MBL enzimini kodlayan gen kasetlerinin bulunduğu class 1 integronlarda genellikle aminoglikozid direncini kodlayan *aacA4* geni de bulunmaktadır. Böylece beta laktam antibiyotiklerin yanı sıra aminoglikozid grubu antibiyotiklere de direnç gelişebilmektedir.

Aminoglikozid ve beta laktam antibiyotikler için direnç genlerini taşıyan gen kasetleri bir integrondan diğerine geçebilir ancak, bir mikroorganizmadan diğerine kendi başlarına hareket edemezler. Plazmidler ve transpozonlar gibi genetik elemanların yardımına ihtiyaç duyarlar [75-78].

2.8. İndüklenebilir Beta-laktamaz Enzimi Tanı Yöntemleri

2.8.1. Disk İndüksiyon Yöntemi

0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra sefoksitin veya imipenem gibi güçlü bir beta-laktamaz indükleyicisinin çevresine(diskler arası mesafe 20 mm olacak şekilde) zayıf indükleyiciler olarak aztreonam veya 3. kuşak sefalosporin diskleri yerleştirilir. Plaklar 37 °C’de bir gece inkübe edildikten sonra zayıf indükleyici disk zon çaplarının güçlü indükleyiciye bakan kısımlarında belirgin zon çapı daralmasının görülmesi(zon çapının bu kısımda ≥ 4 mm daralmış olması) İBL enzimi üretimini gösterir [79-83].

2.8.2. İndükleyici Ajanın Besiyerine Eklenmesi

Hazırlanan bakteri süspansiyonu(0,5 McFarland bulanıklığında) Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra, aztreonam veya diğer zayıf indükleyici 3. kuşak sefalosporin diskleri standart miktarda imipenem içeren ve içermeyen besiyerlerine yerleştirilir. Plaklar 37 °C’de bir gece inkübe edildikten sonra imipenem içeren besiyerindeki inhibisyon zon çapı, imipenem içermeyen besiyerindeki zon çapından ≤ 3 mm ise İBL enzimi üretimi pozitif olarak değerlendirilir [79-83].

2.9. Metallo-Beta-Laktamaz Enzimi Tanı Yöntemleri

P. aeruginosa’da MBL saptanması için henüz Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)’nin önerdiği standart bir tarama testi bulunmamaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL enzimi taşıyan bakterilerin tanımlanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. MBL üretimini saptayabilmek için modifiye Hodge testi ve MBL aktivitesinin etilendiaminotetraasetik asit(EDTA) veya 2-merkaptopropionik asit(MPA) gibi metal şelatör ajanlarla bloke edilmesi esasına

dayanan tarama testleri bu konuda yapılmış pek çok çalışmada yer almaktadır. Modifiye Hodge testi, imipenem/EDTA kombine disk testi, imipenem-EDTA çift disk sinerji testi MBL saptanmasında kullanılan basit tarama testleridir. Bu testlerden başka sonuçları PZR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile doğrulanmış olan E test tarama yöntemleri de vardır. PZR yöntemi başlangıçta MBL üreten izolatları belirlemede kullanışlı bir yöntem iken, bugün sayıları artmış olan MBL tiplerini PZR ile saptamak efektif olmamaktadır [69;84-90].

2.9.1. Modifiye Hodge testi

İmipeneme duyarlı bir bakterinin MBL üreten bir bakteri ile bir arada bulunduğu imipeneme rağmen üreyebilmesi esasına dayanmaktadır. Bu test penisilinaz üreten *N.gonorrhoeae* tespitinde kullanılan Hodge testinin MBL üretimini göstermek için *S.aereus* (ATCC 25923) yerine *E.coli* (ATCC 25922), penisilin diski yerine ise imipenem diski kullanılması ile modifiye edilmiştir. Yöntemi geliştiren Lee ve ark. yaptıkları çalışmalarda imipenem diskine veya Mueller-Hinton agar besiyerine sırasıyla; 140 µg/ml ve 70 µg/ml çinko sülfat eklenerek testin duyarlılığının artırılabilceğini saptamışlardır [86;91;92].

2.9.2. Çift disk sinerji testleri

MBL enzimlerini saptamak için geliştirilmiş fenotipik yöntemlerden birisi de sinerji testleridir. Bu amaçla yapılmış çalışmalarda imipenem 10 µg(IMP) veya seftazidim 30 µg(CAZ) disklerinin EDTA, MPA, sodyummerkaptoasetik asit(SMA) diskleri ile oluşturduğu sinerjiler MBL üretimi pozitif olarak bildirilmiştir. İmipenem-EDTA, İmipenem-MPA, seftazidim-MPA, seftazidim-SMA, İmipenem-EDTA-SMA çift disk sinerji testleri MBL enzimlerini saptamak için kullanılmaktadır [86;88;89;92].

2.9.2.1. İmipenem-EDTA Çift Disk Sinerji Testi

Bu testte amaç imipenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini tespit ederek MBL pozitif izolatları saptamaktır. İmipeneme duyarlı olmayan (dirençli veya orta derecede duyarlı) *blaIMP-1* ve *blaVIM-2* pozitif olduğu

bilinen izolatlarda MBL saptanması amacıyla uygulanmış ve *P. aeruginosa* için duyarlılığı yüksek bulunmuştur [86;92].

2.9.2.2. CAZ-MPA, CAZ-SMA, IMP-EDTA-SMA Çift Disk Sinerji Testleri

Bu tarama testinde; test edilecek seftazidime dirençli *P. aeruginosa* izolatında MBL üretimini saptayabilmek için seftazidim diski etrafındaki inhibisyon zonu ile MPA veya SMA arasında oluşacak sinerjinin araştırılması esastır. MBL inhibitörü olarak CuCl_2 100 mM(5 μl); FeCl_2 100 mM(5 μl); EDTA, 100 mM(5 μl); ve tiyol bileşikleri(2-merkaptopropionik asit, merkaptasetik asit, merkaptotanol) dilüe edilmeden(2-3 μl) kullanılmış ve en iyi sonuçlar 2-merkaptopropionik asit ile elde edilmiştir [88].

İmipeneme dirençli suşlar ile yapılan çift disk sinerji testlerinde seftazidime dirençli olan suşlar ile yapılanlara göre daha iyi sonuçlar alınmıştır [86;92].

Diğer bir MBL tarama çalışmasında seftazidim, sefepim diskleri klavulanik asitle kombine edilerek ve MBL inhibitörü olarak EDTA, MPA, SMA gibi metal şelatörleri kullanılmış; bu yöntemle AmpC tip enzimlerin indüksiyonu ve SHV-12 tipi GSBL üretiminin yanlış pozitifliğe neden olması önlenerek; imipeneme duyarlı suşlarda da MBL üretimi saptanmıştır [89].

2.9.3. Kombine Disk Testi

EDTA'lı ve EDTA'sız imipenem disklerine ait inhibisyon zon çaplarının kıyaslanması ile MBL üretiminin saptanması esasına dayanır. Test edilen *P. aeruginosa* izolatının IMP diski ile IMP/EDTA diskine ait inhibisyon zon çapları arasında ≥ 7 mm fark olması(IMP/EDTA lehine) MBL pozitifliği olarak değerlendirilir. Kombine disk testinde EDTA yerine MPA'de kullanılabilir. Ancak MPA'nın kimyasal olarak uçucu olması ve uzun süre stoklanmasının güçlüğü nedeniyle IMP/EDTA diskleri tercih edilmiştir. EDTA stok solüsyonu stabil olmasına rağmen her test sırasında diske ilave edilmesi zaman alan bir işlemdir. IMP/EDTA disklerinin önceden hazırlanıp, kısa süre inkübatörde kurutulduktan sonra -20 °C'de etkinliğinde azalma olmadan 16 hafta; +4 °C'de ise 12 hafta saklanabilmesi testin uygulanmasını kolaylaştırmaktadır [90].

Yan ve ark.nın çalışmasında IMP/EDTA kombine disk yönteminin imipeneme duyarlı *P. aeruginosa* izolatlarında MBL üretimini saptamakta yetersiz kaldığı, bu

izolatlarda MBL üretimini saptamak için sefepim/klavulanik asit diskinin MPA ile kombine edilerek kullanılabileceği bildirilmiştir [89].

2.9.4. MBL E Test Yöntemi

İmipenem veya seftazidime, EDTA veya MPA eklenerek ticari E test şeritleri geliştirilmiştir. Test şeridinin bir tarafında IMP veya CAZ diğer tarafında ise IMP veya CAZ'e ek olarak sabit konsantrasyonda EDTA veya MPA bulunmaktadır. Test şeritinin bir tarafındaki IMP MİK değerinin, IMP/EDTA'nın olduğu taraftaki MİK değerinden ≥ 3 dilüsyon olması MBL pozitifliği olarak değerlendirilir. Aynı değerlendirme CAZ ve MPA için de geçerlidir. Yapılan çalışmalarda IMP'e duyarlı olmayan izolatlardaki MBL üretimini belirlemede IMP/IMP+EDTA E test(IP/IPI E test) şeritleri; CAZ/MPA E test şeritlerinden daha duyarlı bulunmuştur. İmipeneme duyarlı izolatlarda ise her iki E test şeriti de yetersiz kalmaktadır. Çünkü E test şeridinin IMP veya CAZ kısmı 4-256 µg/ml değerleri arasını belirleyebilmekte ve 4 µg/ml'den düşük MİK değerleri belirlenemediğinden E test ile kıyaslama mümkün olmamaktadır [84;87;89].

2.9.5. EDTA+Fenantirolin+İmipenem Mikrodilüsyon Testi

EDTA+1,10-fenantirolin varlığı ve yokluğunda mikrodilüsyon yöntemi ile imipenem MİK değerlerinin ölçülmesi esasına dayanır. İmipeneme duyarlı olmayan *P. aeruginosa* izolatlarına CLSI standartlarına göre mikrodilüsyon testi çalışılması önerilmektedir. IMP MİK değeri şelatör karışımı varlığında 4 kat ve daha fazla düşük bulunmuş ise izolat VIM tipi veya IMP tipi MBL pozitif olarak değerlendirilir. MBL üretmeyen izolatlarda şelatör karışımı ile MİK değeri ya hiç düşmez ya da 4 kattan daha az düşer. Testin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olup, rutin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılmaya uygun olduğu rapor edilmektedir [85].

2.9.6. Bakteriyel Hücre Ekstraktının Spektrofotometrik Analizi ile İmipenem Hidrolizinin Tespiti

Moleküler yöntemlerden başka araştırma laboratuvarlarınca kabul edilmiş ve altın standart olarak tanımlanmış bir yöntem de bakteriyel hücre ekstraktlarının hazırlanarak, karbapenemlerin hidrolizinin ve sonrasında enzimin EDTA ile

inhibisyonunun gösterilmesidir. Ancak bu teknik için özel spektrofotometrik ekipmanların gerekli oluşu, rutin tanı laboratuvarlarında kullanımını engellemektedir [13].

2.9.7. MBL Tanısında Moleküler Yöntemler

MBL üreten izolatların saptanmasında genotipik yöntemler de kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemlere göre duyarlılığı daha yüksek olan moleküler yöntemlerin dezavantajı; günümüzde MBL enzim subtiplerinin sayıca artmış olmasıdır. PZR, nükleotid sekans amflikasyon yöntemi, blot hibridizasyon yöntemi, izoelektrik fokuslama yöntemi ve poliakrilamid jel elektroforezi MBL tanısında kullanılan moleküler yöntemlerdir [93].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Tanımı

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezinde Ocak 2009-Aralık 2009 tarihleri arasında yatarak tedavi gören hastaların Merkez Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerinden izole edilen, Amerika'daki Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) kriterlerine göre hastanemiz Enfeksiyon Kontrol Komitesince hastane enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanan *P. aeruginosa* izolatları çalışma kapsamına alındı [94]. Hastaların aynı dönemde birden fazla kültür örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarından yalnızca bir tanesi çalışmaya dahil edildi, böylece aynı hastaya ait tekrarlayan örnekler çalışma kapsamı dışında tutuldu. Aynı hastaya ait farklı klinik örneklerde üreyen ve enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen *P. aeruginosa* suşları çalışmaya dahil edildi.

Gram negatif, aerop, nonfermentatif, hareketli, oksidaz pozitif, karakteristik trimetilamin kokusuna sahip, Brain Heart Infusion broth besiyerinde 37 °C ve 42 °C' de üreyen, +4 °C'de üremeyen, Mueller-Hinton agar besiyerinde mavi-yeşil pigment yapan suşlar *P. aeruginosa* olarak değerlendirildi. Bu suşlar Skim Milk saklama besiyerlerine (Difco [BD, Sparks, MD, ABD]) alınarak -70 °C'de stoklandı [19-21]. Çalışmada kontrol suşları olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı [95].

3.2. Mueller-Hinton Agar Besiyeri (MHA)

Mueller-Hinton agar(OXOID, Hampshire, İngiltere) besiyeri hazırlamak için toz halindeki ticari besiyerinden 38 g tartılarak 1000 ml'lik deiyonize su içerisinde çözüldü. Sıcak su banyosu içerisinde 60 °C'de eritildikten sonra, 1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavlandı. Besiyerinin ısısı 50 °C'ye düşünce, 90 mm çaplı steril petri kutularına 4 mm kalınlığında olacak şekilde döküldü. MHA plakları her bir çalışma günü için taze olarak hazırlandı.

Antibiyotik disk difüzyon testleri ve İBL tespiti, imipenem ve meropenem E test(AB BIODISK, Solna, İsveç), modifiye Hodge testi, IPM/EDTA kombine disk testi ve MBL E test(AB BIODISK, Solna, İsveç) yöntemlerinde MHA plakları kullanıldı.

3.3. Antibiyotik Diskleri

Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri (OXOID, Hampshire, İngiltere):

İmipenem 10 µg (IMP)

Meropenem 10 µg (MEM)

Aztreonam 30 µg (ATM)

Seftazidim 30 µg (CAZ)

Sefotaksim 30 µg (CTX)

Sefepim 30 µg (FEP)

Gentamisin 10 µg (CN)

Amikasin 30 µg (AK)

Tobramisin 30 µg (TOB)

Netilmisin 30 µg (NET)

Siprofloksasin 5 µg (CIP)

Piperasilin 100 µg (PRL)

Piperasilin/Tazobaktam 110 µg (TZP)

Sefoperazon/Sulbaktam 105 µg (SCF)

3.4. EDTA Solüsyonu(0,5 Molar)

18,61 g disodium EDTA.H₂O tozu(MERCK, Darmstadt, Almanya) 100 ml'lik steril distile suda çözülerek, pH 8.0'e ayarlandı, +4 °C'de muhafaza edildi. MBL enzim inhibitörü olarak IPM/EDTA kombine disk testinde kullanıldı [90].

3.5. İmipenem ve Meropenem E Test Stripleri

0,02-32 µg/ml imipenem(IP) ve 0,02-32 µg/ml meropenem(MP) içeren E test şeritleri (AB BIODISK, Solna, İsveç) kullanıldı.

3.6. MBL E Test Stripleri

Bir tarafında 4–256 µg/ml imipenem(IP), diğer tarafında ise sabit konsantrasyonda EDTA ile birlikte 1–64 µg/ml imipenem(IPI) içeren MBL E test şeritleri(IP/IPI E test) (AB BIODISK, Solna, İsveç) kullanıldı.

3.7. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

CLSI standartlarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı [95]. Antimikrobiyal duyarlılık testi için daha önce -70 °C'de stoklanmış olan *P. aeruginosa* izolatları kanlı agar besiyerlerine pasajlanarak etüvde bir gece 35 °C'de inkübasyona bırakıldı. 18-24 saatlik inkübasyondan sonra saf olarak üremiş olan *P. aeruginosa* kolonilerinden 0,5 McFarland'a göre bakteri süspansiyonları hazırlanarak, MHA plaklarına ekim yapıldı. 15 dakikalık süre içerisinde antibiyotik diskleri 20 mm aralıklarla plaklara yerleştirildi. Plaklar 35 °C'lik etüvde 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda CLSI yorumlama kriterlerine göre değerlendirildi [95].

Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına ait elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (SPSS Incorporated, Chicago) programında ki-kare testi kullanılarak yapıldı.

Disk difüzyon testi sonuçlarına göre imipenem ve/veya meropeneme dirençli ya da orta derecede duyarlı olarak bulunan izolatlarda, karbapenem direncini doğrulamak ve MİK değerlerini belirlemek için E test yöntemi kullanıldı. E test üretici firmanın önerilerine göre çalışıldı. Bir gecelik inkübasyon sonrası kanlı agar plaklarında üremiş olan taze *P. aeruginosa* kültürlerinden 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri

süspansiyonları hazırlandı ve her bir izolat için bir MHA plağına ekim yapıldı. 15 dakikalık süre içerisinde imipenem ve meropenem E test şeritleri birbirlerine zıt yönde olacak şekilde plaklara yerleştirildi ve 35 °C'lik etüvde 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklar üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirilerek imipenem ve meropenem MİK değerleri belirlendi.

3.8. İBL Üretimin Araştırılması

İBL üretimi disk indüksiyon yöntemi ile tespit edildi. MHA plağında İBL aktivitesini belirleyebilmek için; disk merkezleri arası uzaklık 20 mm olacak şekilde, seftazidim ve aztreonam disklerinin ortasına imipenem diski yerleştirildi. 35 °C'lik etüvde 18-20 saat inkübasyondan sonra MHA plağındaki seftazidim ve aztreonam disklerine ait inhibisyon zon çaplarının imipenem diskine bakan kısımlarındaki daralma (≥ 4 mm) İBL pozitifliği olarak değerlendirildi. Negatif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı [80-83].

3.9. MBL Üretiminin Araştırılması

MBL üretimi modifiye Hodge testi ve IMP/EDTA kombine disk testi ve IP/IPI E test ile değerlendirildi.

3.9.1. Modifiye Hodge Testi

E. coli ATCC 25922 suşu kanlı agar plağına ekim yapılarak bir gece etüvde 35 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda *E. coli* ATCC 25922 kolonilerinden 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak, MHA plağının tüm yüzeyini kaplayacak şekilde ekimi yapıldı. Plak 15 dakika kurumaya bırakıldıktan sonra merkeze IMP diski yerleştirildi. E test ile imipenem ve/veya meropenem MİK değerleri belirlenerek, dirençli veya orta derecede duyarlı bulunmuş olan *P. aeruginosa* suşlarının ekimi karşılıklı olacak şekilde, merkezden perifer doğru çizgi şeklinde yapıldı. 35 °C'de 20 saatlik inkübasyondan sonra IMP diskinin oluşturduğu inhibisyon zon çapında görülen yonca yaprağı şeklinde en küçük bir bozulma MBL pozitifliği olarak değerlendirildi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 negatif kontrol olarak kullanıldı [86;91;92].

3.9.2. IMP/EDTA Kombine Disk Testi

MHA plağı üzerine E test ile imipenem ve/veya meropeneme dirençli veya orta derecede duyarlı bulunmuş olan *P. aeruginosa* suşlarının ekimi yapıldı. Plağın bir yarısına 25 mm aralıkla iki adet IMP diski yerleştirildi. Bir tanesinin üzerine daha önceden hazırlanmış olan 0,5 M EDTA solüsyonundan 10 µl pipetle damlatılarak diskin solüsyonu absorbe etmesi sağlandı. 35 °C'deki etüvde 18 saatlik inkübasyon sonrasında IMP/EDTA diski etrafındaki inhibisyon zon çapının, IMP diski etrafındaki inhibisyon zon çapından ≥ 7 mm olması MBL pozitif olarak değerlendirildi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 negatif kontrol olarak kullanıldı [90].

3.9.3. IP/IPI E Test Yöntemi

Üretici firmanın önerilerine göre çalışıldı. Bir gecelik inkübasyon sonrasında imipenem ve/veya meropeneme dirençli veya orta derecede duyarlı bulunmuş olan *P. aeruginosa* izolatlarından 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanarak, CLSI önerilerine göre MHA plaklarına ekildi. IP/IPI E test şeritleri plaklara yerleştirildi. 35 °C'deki etüvde 18 saatlik inkübasyon sonrasında IMP için bulunan MİK değeri, IMP/EDTA için bulunan MİK değerine oranlandı. Üretici firmanın önerilerine göre ≥ 3 dilüsyonluk(≥ 8 kat) fark saptanan izolatlar MBL pozitif olarak değerlendirildi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 negatif kontrol olarak kullanıldı [84;87;89].

4. BULGULAR

4.1. Epidemiyolojik Bilgiler

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezinde Ocak 2009 ile Aralık 2009 tarihleri arasında yatarak tedavi gören hastalardan, hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilmiş olan 110 *P. aeruginosa* izolatı çalışma kapsamına alındı.

P. aeruginosa izolatlarının % 86'sı idrar, trakeal aspirat, kan ve yara örneklerinden izole edildi. İzolatların klinik örneklerle ve infeksiyonlara göre dağılımları Tablo 6 ve Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 6. 110 *P. aeruginosa* izolatının klinik örneklerle göre dağılımı.

Örnek	Sayı	(%)
İdrar	36	(32.7)
Trakeal aspirat	29	(26.4)
Kan	17	(15.5)
Yara	13	(11.8)
Balgam	8	(7.3)
Dren	4	(3.6)
Parasentez	2	(1.8)
Katater	1	(0.9)
Toplam	110	

Tablo 7. 110 *P. aeruginosa* izolatının infeksiyonlara göre dağılımı.

İnfeksiyon türü	Sayı	(%)
İdrar yolu infeksiyonu	36	(32.7)
Ventilatör ilişkili pnömoni	26	(23.6)
Cerrahi alan infeksiyonu	15	(13.6)
Pnömoni	12	(10.9)
Sepsis	9	(8.2)
Ürosepsis	7	(6.4)
Yara infeksiyonu	2	(1.8)
Peritonit	2	(1.8)
Katater infeksiyonu	1	(0.9)
Toplam	110	

P. aeruginosa infeksiyonlarının % 67'si 45 yaş üzeri hastalarda saptandı. İnfeksiyon gelişen hastaların % 78'inde altta yatan hastalık ve/veya infeksiyonu kolaylaştırıcı invaziv girişimler mevcut idi. Altta yatan hastalıklar arasında en sık olarak malignite(% 16), diabetes mellitus(% 7), karaciğer yetmezliği(% 6), kronik obstrüktif akciğer hastalığı(% 6), kronik böbrek yetmezliği(% 5) tespit edildi. Mekanik

ventilasyon(% 32), major cerrahi uygulamaları(% 24) ve üriner kataterizasyon(% 14) ise en sık uygulanan invaziv girişimler idi. *P. aeruginosa* örnekleri en sık olarak Reanimasyon Yoğun Bakım, Dahiliye Yoğun Bakım, Genel Cerrahi ve Nöroloji servislerinden izole edildi. Suşların izole edildikleri servislere göre dağılımları Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. 110 *P. aeruginosa* izolatının izole edildikleri servislere göre dağılımı.

Servis	Sayı	(%)
Reanimasyon Yoğun Bakım	26	(23.6)
Dahiliye Yoğun Bakım	12	(10.9)
Genel Cerrahi	9	(8.2)
Nöroloji	9	(8.2)
Pediyatri Yoğun Bakım	7	(6.4)
Gastroenteroloji	6	(5.5)
Organ Nakli	5	(4.5)
Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım	5	(4.5)
Üroloji	4	(3.6)
Beyin Cerrahisi	4	(3.6)
Pediyatri	4	(3.6)
Ortopedi ve Travmatoloji	3	(2.7)
Plastik Cerrahi	3	(2.7)
Kadın Hastalıkları ve Doğum	2	(1.8)
Genel Cerrahi Yoğun Bakım	2	(1.8)
Koroner Yoğun Bakım	2	(1.8)
Diğer	7	(6.4)
Toplam	110	

Diğer: Radyasyon Onkolojisi, Hematoloji, Psikiyatri, Endokrinoloji, Kardiyoloji, Nefroloji, Yenidoğan Yoğun Bakım

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

Antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre *P. aeruginosa* izolatlarının % 2,7(3/110)’si çalışılan tüm antipseudomonal ilaçlara duyarlı, % 49(54/110)’u sefotaksim dışındaki tüm antipseudomonal ilaçlara duyarlı olarak bulundu. İzolatların % 12(13/110)’sinin en az üç antipseudomonal ilaç grubuna dirençli(MDR) olduğu saptandı. *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılığı Tablo 9’da gösterilmiştir.

P. aeruginosa izolatlarında duyarlılık oranı % 100 olan kolistin en etkin antibiyotik gibi görülüyorsa da; kolistin, seftazidim ve sefepim arasındaki etkinlik farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır($p>0,10$).

Kolistin; piperasilinler ve amikasin den anlamlı($p<0,01$); kalan diğer antibiyotiklerden ise ileri derecede anlamlı($p<0,0001-0,003$) olarak daha etkin bulunmuştur.

İmipenem ile meropenem arasındaki etkinlik farkı anlamlı olmadığı saptanmıştır($p>0,10$). Aralarında anlamlı etkinlik farkı bulunmayan seftazidim ve sefepim, karbapenemlerden ileri derecede anlamlı olarak daha etkin bulunmuştur($p<0,0001-0,002$).

Amikasin, tobramisin ve gentamisin arasındaki etkinlik farkı anlamlı değildir($p>0,10$), ancak bu üç antibiyotik netilmisinden (ileri derecede anlamlı olarak) daha etkin bulunmuştur ($p< 0,0001-0,001$).

Tablo 9. 110 *P. aeruginosa* izolatının antimikrobiyallere duyarlılığı

Antibiyotik	Duyarlı		Dirençli	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
İmipenem	82	(75)	28	(25)
Meropenem	91	(83)	19	(17)
Seftazidim	107	(97)	3	(3)
Sefotaksim	5	(5)	105	(95)
Sefepim	106	(96)	4	(4)
Aztreonam	87	(79)	23	(21)
Piperasilin	103	(94)	7	(6)
Piperasilin/tazobaktam	103	(94)	7	(6)
Amikasin	103	(94)	7	(6)
Gentamisin	97	(88)	13	(12)
Tobramisin	99	(90)	11	(10)
Netilmisin	75	(68)	35	(32)
Siprofloksasin	101	(92)	9	(8)
Sefoperazon/Sulbaktam	98	(89)	12	(11)
Kolistin	110	(100)	0	(0)

Yirmi dokuz *P. aeruginosa* izolatında disk difüzyon metodu ile karbapenem direnci saptandı ve bu direnç imipenem ve/veya meropenem E test ile doğrulandı. İmipenem E test ile izolatların 15'i dirençli(MİK ≥ 16 µg/ml), 13'ü orta derecede duyarlı(MİK: 8-12 µg/ml) olarak bulundu. İmipeneme duyarlı(MİK: 4 µg/ml) olan bir izolatın meropeneme dirençli(MİK: 16 µg/ml) olduğu belirlendi. *P. aeruginosa* suşlarının imipenem ve meropenem duyarlılıkları Tablo 10'da gösterilmiştir

Tablo 10. 110 *P. aeruginosa* izolatının imipenem ve meropenem duyarlılığı.

		Meropenem		Toplam
		Duyarlı	Dirençli*	
İmipenem	Duyarlı	81	1	82
	Dirençli*	10	18	28
	Toplam	91	19	110

*İmipenem ve/veya meropeneme orta derecede duyarlı olan izolatlar da tabloda dirençli olarak gösterilmiştir.

Karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatının izole edildikleri klinik örneklerle ve servislere dağılımları Tablo 11 ve Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatının klinik örneklerle göre dağılımı.

Örnek	Sayı	(%)
Trakeal aspirat	10	(34.5)
İdrar	6	(20.7)
Yara	4	(13.8)
Kan	3	(10.3)
Dren	3	(10.3)
Balgam	2	(6.9)
Katater	1	(3.4)
Toplam	29	

Tablo 12. Karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatının servislere göre dağılımı.

Servis	Sayı	(%)
Reanimasyon Yoğun Bakım	8	(27.6)
Pediyatri Yoğun Bakım	5	(17.2)
Gastroenteroloji	3	(10.3)
Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım	2	(6.9)
Genel Cerrahi Yoğun Bakım	2	(6.9)
Organ Nakli	2	(6.9)
Dahiliye Yoğun Bakım	1	(3.4)
Koroner Yoğun Bakım	1	(3.4)
Nöroloji	1	(3.4)
Genel Cerrahi	1	(3.4)
Pediyatri	1	(3.4)
Hematoloji	1	(3.4)
Ortopedi ve Travmatoloji	1	(3.4)
Toplam	29	

Karbapenemlere dirençli yirmi dokuz *P. aeruginosa* izolatının antibiyotiklere duyarlılıkları Tablo 13’te gösterilmiştir.

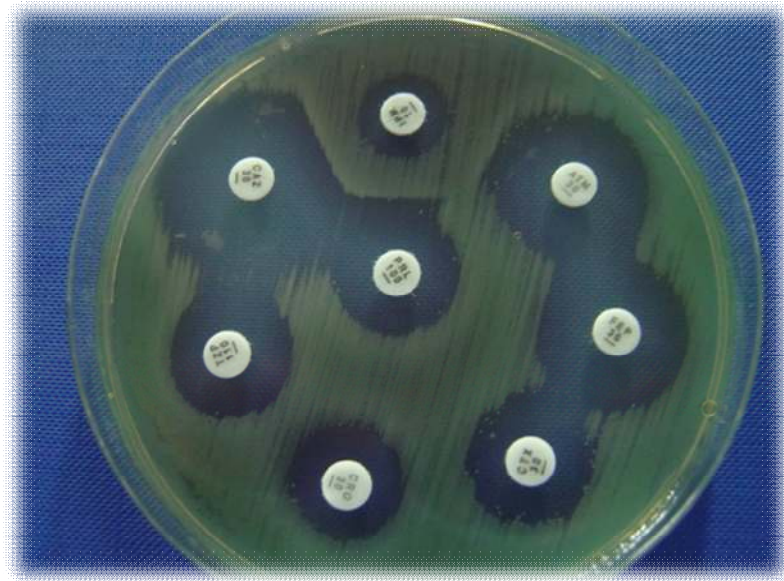
Aralarında istatistiksel olarak anlamlı etkinlik farkı bulunmayan kolistin, seftazidim ve sefepim($p>0,05$) karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında in vitro en etkin antibiyotikler olarak bulunmuştur. Seftazidim, sefepim, piperasilinler, siprofloksasin, amikasin, gentamisin ve tobramisin arasında istatistik olarak anlamlı etkinlik farkı bulunmamıştır($p>0,10$). Amikasin, tobramisin, gentamisin ve netilmisin arasında da anlamlı etkinlik farkı bulunmamıştır($p>0,05$).

Tablo 13. Karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatının antimikrobiyallere duyarlılığı.

Antibiyotik	Duyarlı		Dirençli	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
İmipenem	1	(3)	28	(97)
Meropenem	10	(35)	19	(65)
Seftazidim	26	(90)	3	(10)
Sefotaksim	0	(0)	29	(100)
Sefepim	25	(86)	4	(14)
Aztreonam	13	(45)	16	(55)
Piperasilin	22	(76)	7	(24)
Piperasilin/tazobaktam	22	(76)	7	(24)
Amikasin	23	(79)	6	(21)
Gentamisin	21	(72)	8	(28)
Tobramisin	23	(79)	6	(21)
Netilmisin	15	(52)	14	(48)
Siprofloksasin	20	(69)	9	(31)
Sefoperazon/Sulbaktam	19	(65)	10	(35)
Kolistin	29	(100)	0	(0)

4.3. Disk İndüksiyon Testi Sonuçları

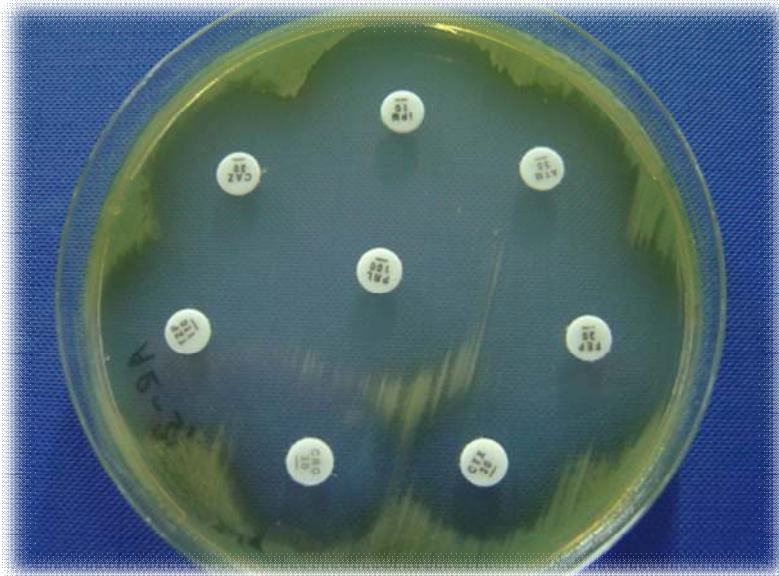
P.aeruginosa izolatlarında İBL üretimi disk indüksiyon yöntemiyle araştırıldı. İzolatların % 90(99/110)'ında İBL pozitif, % 6,4(7/110)'ünde İBL negatif olarak saptandı. İzolatların % 3,6(4/110)'sında İBL varlığı değerlendirilemedi(Resim 1, 2, 3, 4).



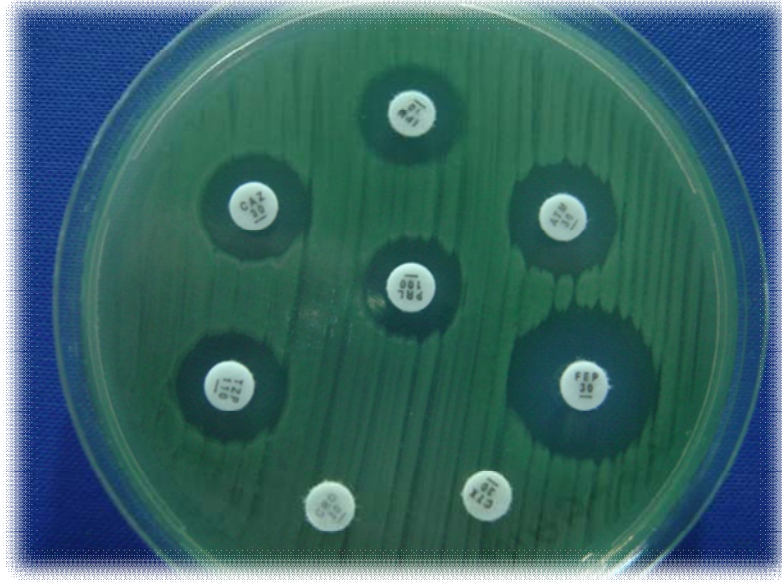
Resim 1. İBL pozitif *P. aeruginosa* izolatı(imipeneme dirençli)



Resim 2. İBL pozitif *P. aeruginosa* izolatu(imipeneme duyarlı)



Resim 3. İBL negatif *P. aeruginosa* izolatu



Resim 4. İBL üretiminin değerlendirilemediği *P. aeruginosa* izolatu

4.4. Modifiye Hodge Testi, Kombine Disk Testi ve MBL E Test Sonuçları

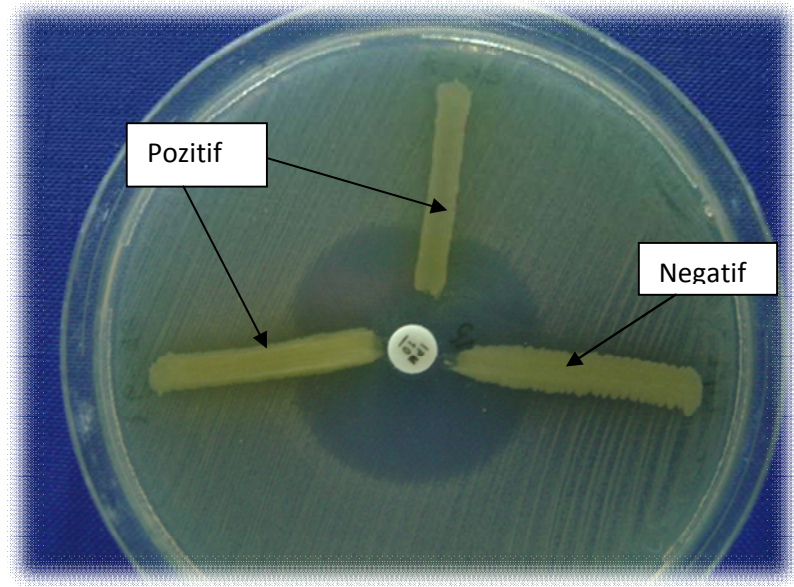
Karbapenemlere dirençli 29 izolatta MBL üretimini belirlemek için yapılan fenotipik testlerden E test ile iki izolat MBL pozitif olarak bulunmuştur. Bu iki izolat kombine disk testi ile de pozitif sonuç vermiştir. E test ile negatif sonuç alınan dört izolatta kombine disk testi ile pozitif sonuç alınmıştır. Kombine disk testi ile negatif sonuç alınan izolatların tümünde E test sonuçları negatif olarak saptanmıştır. IMP/EDTA Kombine disk testi ile MBL E testin birbirleriyle uyumu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Uyum(\%): } a+b/c \times 100$$

- a: Her iki test ile pozitif sonuç veren izolat sayısı: 2
- b: Her iki test ile negatif sonuç veren izolat sayısı: 23
- c: Toplam izolat sayısı: 29

Buna göre; IMP/EDTA Kombine disk testi ile MBL E test birbirleriyle % 86 oranında uyumlu bulunmuştur.

Modifiye Hodge testi, E test ve Kombine disk testinden oldukça farklı sonuçlar vermiştir(Resim 5). Modifiye Hodge testinin değerlendirilmesi sırasında negatif kontrol olarak çalışılan *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun şüpheli pozitiflik vermesi ve testin tekrarında da pozitif olarak değerlendirilmesiyle test sonuçlarının güvenilirliği sorgulanmış ve MBL üreten suşlar Kombine disk testi ve E test sonuçlarına göre belirlenmiştir.



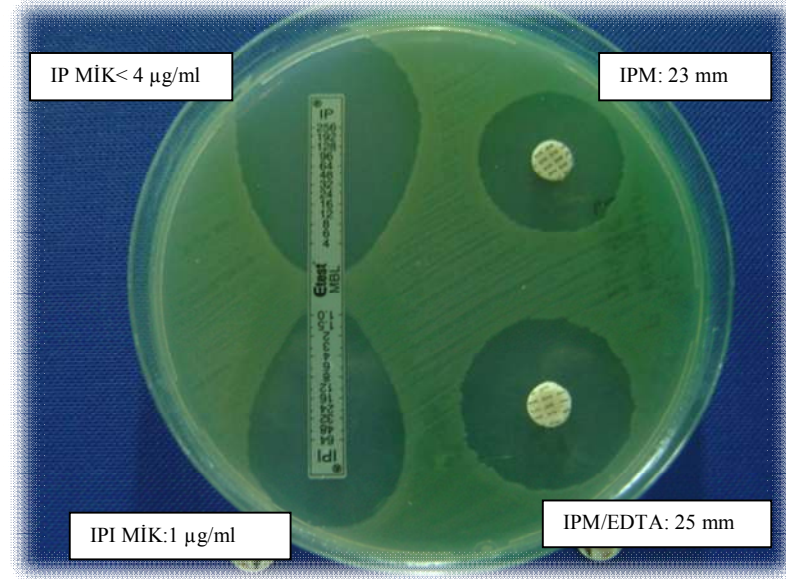
Resim 5. Modifiye Hodge testi

MBL enzimini saptamada kullanılan üç fenotipik yöntemin sonuçları Tablo 14’te gösterilmiştir.

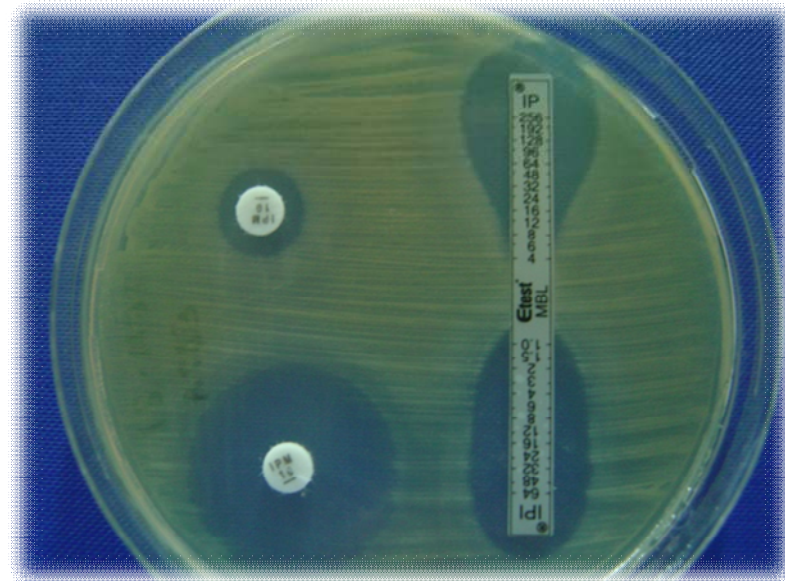
Tablo 14. Karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatında ve standart suşta fenotipik testlerle MBL tespit sonuçları

	Fenotipik Yöntemler		
	Modifiye Hodge Testi	Kombine Disk Testi	E test
Pozitif	10(%34)	6(%21)	2(%7)
Negatif	17(%59)	23((%79)	27(%93)
Belirlenemeyen	2(%7)	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853(Negatif kontrol)	Pozitif	Negatif	Negatif

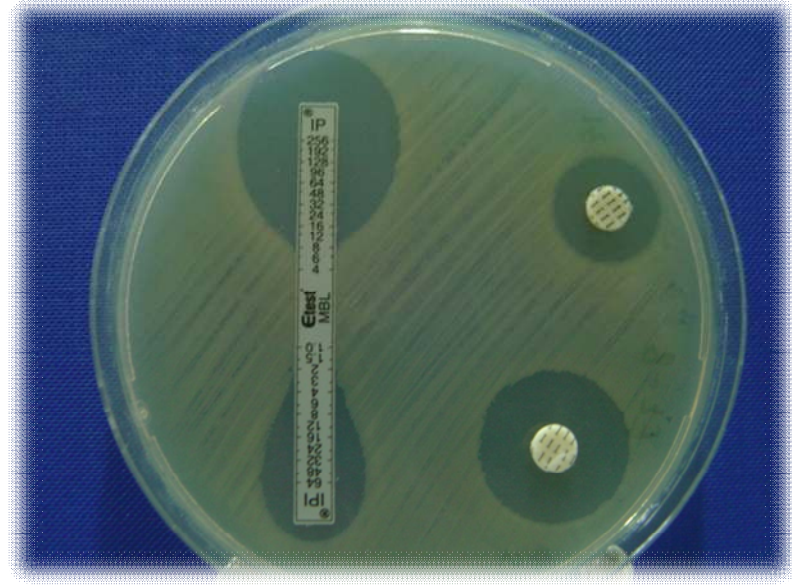
Kombine disk testi ile MBL üretimi pozitif bulunan toplam altı izolatin IMP ve IPM/EDTA inhibisyon zon çapları arasındaki farklar 7-11 mm arasında değişmekte olup, ortalama fark 9 mm olarak bulunmuştur. Kombine disk testi ile negatif sonuç veren 23 izolatta inhibisyon zon çapları arasındaki farkın 1-6 mm arasında değiştiği, ortalama farkın 4,5 mm olduğu saptanmıştır(Resim 6, 7, 8, 9).



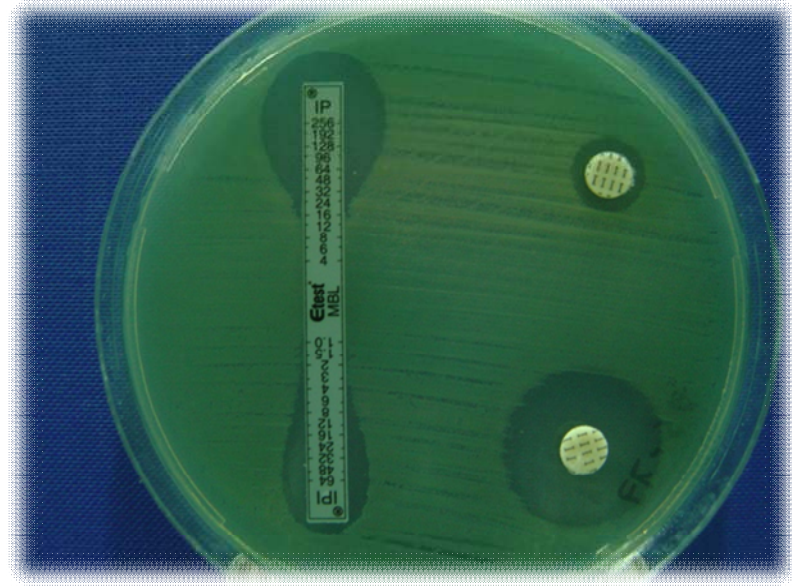
Resim 6. MBL E test ve kombine disk testi ile *P. aeruginosa* ATCC 27853 negatif kontrol



Resim 7. MBL E test ve kombine disk testi ile MBL pozitifliği



Resim 8. MBL E test ve kombine disk testi ile MBL negatifliği



Resim 9. MBL E test negatif, kombine disk testi pozitif izolat

E test ve Kombine disk testinin her ikisiyle de pozitif sonuç alınan iki izolat, MBL enzimi üreten izolatlar olarak kabul edilmiştir. Buna göre karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatı içerisinde, MBL üreten izolatların oranı % 7(2/29) olarak

belirlenmiştir. Çalışılan 110 *P. aeruginosa* izolatları içerisinde MBL üretenlerin oranı % 1,8(2/110) olarak belirlenmiştir. MBL pozitif iki izolata ait test sonuçları Tablo 15’de gösterilmiştir.

Tablo 15. E test ve Kombine disk testi ile MBL pozitif bulunan iki *P. aeruginosa* izolatının test sonuçları

	MBL Kombine disk testi		MBL E test	
	IMP	IMP/EDTA	IMP	IMP/EDTA
1 nolu MBLpozitif izolat	13 mm	23 mm	2 µg/ml	24 µg/ml
2 nolu MBLpozitif izolat	15 mm	24 mm	2 µg/ml	16 µg/ml

1 nolu MBL pozitif izolat Organ Nakli Servisinde yatmakta olan karaciğer transplantasyonu yapılmış bir hastanın dren kültüründen izole edilmiş ve cerrahi alan enfeksiyonu etkeni olarak tanı almıştır.

2 nolu MBL pozitif izolat Koroner Yoğun Bakım Servisinde yatmakta olan ve solunum yetmezliği nedeniyle mekanik ventilatöre bağlı bir hastanın trakeal aspirat kültüründen izole edilmiş ve ventilatör ilişkili pnömoni etkeni olarak tanı almıştır.

E test ve Kombine disk testi ile MBL üretimi pozitif bulunan bu iki izolata ait antibiyotik duyarlılık testi sonuçları Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 16. E test ve Kombine disk testi ile MBL pozitif bulunan iki *P. aeruginosa* izolatının antimikrobiyallere duyarlılığı

Antibiyotik	1 Nolu MBL pozitif izolat		2 Nolu MBL pozitif izolat	
	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
İmipenem	-	+	-	+
Meropenem	-	+	-	+
Seftazidim	+	-	+	-
Sefotaksim	-	+	-	+
Sefepim	+	-	+	-
Aztreonam	-	+	+	-
Piperasilin	+	-	+	-
Piperasilin/tazobaktam	+	-	+	-
Amikasin	+	-	+	-
Gentamisin	+	-	+	-
Tobramisin	+	-	+	-
Netilmisin	-	+	-	+
Siprofloksasin	+	-	+	-
Sefoperazon/Sulbaktam	+	-	+	-
Kolistin	+	-	+	-

5. TARTIŞMA

P. aeruginosa hastane infeksiyonlarının en önemli ve en sık nedenlerinden olup, tüm hastane infeksiyonlarının % 10'unda etken olarak izole edilmektedir [1;7]. Avrupa'da 17 ülkeden 1417 yoğun bakım ünitesinin katıldığı European Prevalence Infection in Intensive Care (EPIC) çalışmasında sırasıyla; *Enterobacteriaceae* ailesi, *S. aureus*, *P. aeruginosa* en sık izole edilen nozokomiyal infeksiyon etkenleri olarak bildirilmiştir [6].

Hastanemizde 2007 yılında yapılmış çalışmada; yoğun bakım ünitelerindeki nozokomiyal infeksiyon etkenlerinin dağılımı incelenmiş ve *Pseudomonas* spp. % 20.4'lük oran ile en fazla izole edilen etken olarak bulunmuştur. Çalışmada *Pseudomonas* izolatları en sık olarak Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinde yatan hastaların trakeal aspirat ve idrar örneklerinden izole edilmiştir [96].

Özellikle yoğun bakımlar başta olmak üzere, yanık üniteleri, kanser kemoterapisi ve radyoterapi üniteleri, organ transplantasyon üniteleri ve hastane genelinde yoğun antibiyotik tedavisi uygulanan üniteler *P. aeruginosa* infeksiyonlarının sık görüldüğü servislerdir [9;97]. Solunum yolu, deri-yumuşak doku ve üriner sistem infeksiyonları, bakteriyemi, endokardit ve menenjit *P. aeruginosa*'nın sıklıkla neden olduğu infeksiyonlardır [20;22].

Türkiye'de yapılan birçok çalışmada idrar, solunum yolu, yara ve kan örnekleri *P. aeruginosa* suşlarının en sık izole edildikleri örnekler olarak bildirilmiştir [98-108]. Bu çalışmaların çoğunda *P. aeruginosa*'nın en sık izole edildiği servislerin yoğun bakım üniteleri olduğu belirtilmektedir [99-102;104;106].

Çalışmamızda *P. aeruginosa* suşları başta Reanimasyon Yoğun Bakım ve Dahiliye Yoğun Bakım olmak üzere 23 farklı servisten izole edilmiştir(bkz. Tablo 8).

P. aeruginosa'nın etken olarak en sık izole edildiği infeksiyonlar sırasıyla; idrar yolu infeksiyonları(ürosepsisli hastalarla birlikte % 39) ve pnömoni(% 35) şeklindedir. Ayrıca cerrahi alan infeksiyonları ve sepsis etkenin sık olarak izole edildiği diğer infeksiyonlar olmuştur. Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* suşlarının en sık izole edildikleri örnekler ise sırasıyla; idrar, trakeal aspirat, kan, yara ve balgam örnekleridir.

P. aeruginosa infeksiyonlarının morbidite ve mortalitesi oldukça yüksektir. Birçok antibiyotiğe doğal direncinin yanı sıra, klinikte hastalara uygulanan antibiyotik tedavisi sırasında da suşlar çeşitli direnç mekanizmalarıyla antibiyotiklere direnç geliştirebilmekte, böylece giderek artmakta olan antibiyotik direnci problem oluşturmaktadır [1;23;24]. Kromozomal ve plazmid kaynaklı beta-laktamazların üretimi en önemli direnç mekanizmasıdır. Antibiyotik hedeflerinde değişiklik, porin proteinlerindeki değişiklik sonucu dış membran geçirgenliğinin azalması, eflüks pompa sistemleri ile antibiyotığın dışarı atılması diğer etkili direnç mekanizmaları [11].

P. aeruginosa infeksiyonlarının tedavisinde beta laktam antibiyotikler, aminoglikozidler, kinolonlar ve polimiksinler sıklıkla etkilidir. Ciddi *P. aeruginosa* infeksiyonlarının ampirik tedavisinde beta laktam antibiyotiklerin aminoglikozidler veya kinolonlar ile kombine edilerek kullanımının yanı sıra monoterapide kullanımları da yaygındır [20].

P. aeruginosa izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları üzerine yapılmış geniş kapsamlı çalışmalardan birisi 1999 yılında İngiltere'de 25 hastaneden toplam 2194 izolatın antimikrobiyallere direncinin değerlendirildiği çalışmadır. Çalışmada direnç oranları imipeneme % 8,1; seftazidime % 2,3; piperasiline % 3,9; siprofloksasine % 8,1; amikasin % 5,6 ve gentamisine % 11,1 olarak bildirilmiştir [9].

Eldere ve ark. 1999 yılında Belçika ve Lüksemburg'daki 40 farklı hastaneden nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak izole edilmiş, 716 *P. aeruginosa* suşunda mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal ilaç direncini araştırmışlardır. Suşların % 38'i yoğun bakım hastalarından izole edilmiş olup, solunum yolu örnekleri ve idrar örnekleri etkenin en sık izole edildiği örnekler olarak bulunmuştur. Çalışmada meropenem direnci % 9,5; seftazidim % 28,5; sefepim % 29,5; aztreonam % 55,5; piperasilin % 24; piperasilin/tazobaktam % 17,5; siprofloksasin % 24; amikasin % 10,5; gentamisin % 23,5 ve tobramisin direnci % 19,5 olarak saptanmıştır. Çalışmaya katılan 40 hastanedeki *P. aeruginosa* antibiyotik direnç oranlarının birbirlerinden anlamlı derecede farklı olduğu bildirilmiştir [97].

ABD’de 2000 yılında 250’den fazla hastanedeki 70.000’den fazla *P. aeruginosa* izolatının değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise imipenem direnci % 14,2; seftazidim % 11,5; piperasilin % 15,8; siprofloksasin % 29,5; amikasin % 7,1 ve gentamisin direnci % 19,1 olarak bulunmuştur [9].

ABD’de 1999-2003 yılları arasındaki dört yıllık dönemde 29 laboratuvarın katıldığı bir çalışmada 52.637 *P. aeruginosa* izolatının antimikrobiyallere direnci araştırılmıştır. Çalışmada dirençli suşlar özellikle yoğun bakım hastalarından ve alt solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir. İmipenem direnci % 14; sefepim % 10; seftazidim % 13; siprofloksasin % 31; piperasilin % 16; piperasilin/tazobaktam % 11; amikasin % 7; gentamisin % 19 ve tobramisin direnci % 13 olarak saptanmıştır [109].

Malezya’da 2005 yılında 505 klinik *P. aeruginosa* izolatının antimikrobiyallere direncinin incelendiği bir çalışmada imipenem direnci % 9,9; siprofloksasin % 11,3; piperasilin/tazobaktam % 9,4; seftazidim % 10,9; sefoperazon % 14,5; amikasin % 6,7 ve gentamisin direnci % 12,8 olarak bildirilmiştir [110].

MYSTIC(Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 çalışmasında Avrupa’daki 40 merkezden toplanan 1.012 *P. aeruginosa* izolatının antimikrobiyallere direnci araştırılmıştır. Çalışmada meropenem direnci % 22; imipenem % 32; seftazidim % 25; siprofloksasin % 33; piperasilin/tazobaktam % 15; amikasin % 23; gentamisin % 29 ve tobramisin direnci % 35 olarak bildirilmiştir [111].

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) 2007 yılı verilerine göre *P. aeruginosa*’da karbapenem direnci Yunanistan, İtalya, Almanya, Türkiye, Çek Cumhuriyeti ve Hırvatistan’da % 25’in üzerinde iken; Hollanda, Danimarka, İsviçre, İsveç ve Finlandiya’da % 10’un altındadır. EARSS 2007 çalışmasının bütününe bakıldığında çalışmaya katılan Avrupa ülkelerinde *P. aeruginosa* için karbapenem direnci % 3,9–50,5; seftazidim direnci % 4–44,8; kinolon direnci % 7,2–42,7; piperasilin direnci % 3,1–48,5; aminoglikozid direnci % 0–51,9 aralığında değişmektedir. Bu beş antimikrobiyal gruba direncin en fazla olduğu ülkeler Yunanistan, Çek Cumhuriyeti, Polonya olup; direncin çok daha düşük olduğu ülkeler İsveç, Norveç, Danimarka, İsviçre, Hollanda, Finlandiya, Avusturya ve İngiltere olarak dikkati çekmektedir. Aralarında Türkiye’nin de bulunduğu diğer ülkelere ise direnç oranları bu iki grubun arasında yer almaktadır(The National Institute for Public Health and the Environment. EARSS database 2007: <http://www.rivm.nl/earss/database/>) [112]. Otuz üç Avrupa ülkesindeki *P. aeruginosa* antimikrobiyal direnç oranlarını içeren bu çalışmanın verileri Tablo 17’de gösterilmiştir.

2006 EARSS raporunda Avrupa'daki *P. aeruginosa* suşlarının % 18'inin üç veya daha fazla antipseudomonal ilaca dirençli olduğu belirtilmektedir. En yaygın direnç fenotipinin piperasilinler, seftazidim, aminoglikozidler, florokinolonlar ve karbapenemlere kombine direnç şeklinde görüldüğü, diğer ikinci ve üçüncü en yaygın direnç paternlerinin ise tek başına karbapenemlere veya kinolonlara direnç olarak görüldüğü bildirilmiştir [113].

Tablo 17. EARSS verilerine göre Avrupa ülkelerindeki *P. aeruginosa* antimikrobiyal direnç oranları

Ülke	Dirençli izolat oranı(%)				
	Aminoglikozidler	Karbapenemler	Kinolonlar	Seftazidim	Piperasilinler
Avusturya	11,2	13,7	17,9	9	7,1
İsviçre	4,8	5,4	7,2	4,2	5
Kıbrıs	25	21,1	21,2	15,4	28,8
Çek Cumhuriyeti	33,8	36	42,7	32,7	30
Almanya	20,3	31,5	35,7	24,4	48,5
Danimarka	2,4	3,9	9,1	4	4,8
İspanya	23,9	18,4	27,7	15,2	8,1
Finlandiya	8,7	9,4	10,9	7,7	7,3
Fransa	31,1	18,4	26,3	18,6	20,5
Yunanistan	51,9	50,5	51,9	44,8	38,4
Hırvatistan	43,4	28,1	33	20,5	30,2
Macaristan	34,4	21,3	29,5	15,3	16,8
İrlanda	12,5	11,2	20,5	10,3	11,8
İsrail	21,9	14,9	26,7	13,3	15,2
İtalya	30,1	32,1	39,1	41,4	27,2
Hollanda	9,8	5,4	9,4	5,6	5,2
Norveç	1,9	14,5	10,7	6,7	3,1
Polonya	40,3	22,4	40,3	22,7	35,8
Portekiz	18,2	16,1	23	20,9	15,8
İsveç	0	9	10,3	9,6	3,1
Slovenya	13,6	20,4	18,1	13,6	12,5
Türkiye	28,2	31	29,6	31,3	32,4
İngiltere	6,6	17,2	9,6	14,1	5,4

*Kaynak: EARSS database 2007 : <http://www.rivm.nl/earss/database/> **Aminoglikozidler olarak gentamisin veya tobramisin; Karbapenemler olarak imipenem veya meropenem; Kinolonlar olarak siprofloksasin, norfloksasin, levofloksasin veya perfloksasin; Piperasilinler olarak piperasilin veya piperasilin/tazobaktam çalışılmıştır. ***50 izolattan az veriler tabloda yer almamıştır.

Tablo 18'de yer alan Türkiye'deki *P. aeruginosa* suşları için 2006-2009 yıllarına ait EARSS verileri incelendiğinde, beş antimikrobiyal ilaç grubunun hepsi için direncin düşme eğiliminde olduğu görülmektedir(The National Institute for Public Health and the Environment: EARSS database 2009: <http://www.rivm.nl/earss/database/>) [112]

Tablo 18. EARSS verilerine göre 2006-2009 yılları arasında Türkiye’deki *P. aeruginosa* suşlarının antimikrobiyallere direnç oranları

Yıl	Dirençli izolat oranı (%)				
	Aminoglikozidler	Karbapenemler	Kinolonlar	Seftazidim	Piperasilinler
2006	33,7	33,7	32	27,9	31,9
2007	28,2	31	29,6	31,3	32,4
2008	22,5	34	28,8	29,3	22,1
2009	15,4	27,8	29,3	25,5	26,1

*Kaynak: EARSS database 2006-2009: <http://www.rivm.nl/earss/database/> **Aminoglikozidler olarak gentamisin veya tobramisin; Karbapenemler olarak imipenem veya meropenem; Kinolonlar olarak siprofloksasin, norfloksasin, levofloksasin veya perfloksasin; Piperasilinler olarak piperasilin veya piperasilin/tazobaktam çalışılmıştır.

Türkiye’de *P. aeruginosa* izolatları için yapılmış çok sayıda antimikrobiyal duyarlılık çalışması bulunmaktadır. Yurdumuzda yakın zamanda yapılmış 21 çalışmadaki *P. aeruginosa* antimikrobiyal direnç oranları Tablo 19’da gösterilmiştir.

Tablo 19. Türkiye’de yapılmış çeşitli çalışmalardaki *P. aeruginosa* suşlarının antimikrobiyallere direnç oranları(%)

Kaynak/Yıl/Suş Sayısı	IMP	MEM	CAZ	FEP	SCF	ATM	CIP	PRL	TZP	AK	GM	TOB	NET
[114] Gençler ve Ark.2001. (99 suş)	37	37	35	46	41		25		40	27	56		
[115] Gönülgür ve Ark.1999-2003. (249 suş)	22		51		39	67	16	22		25	58	58	
[116] Ersöz ve Ark.2002. (34 suş)*	29	29	38	32		59	15			38	56	44	41
[117] Kadanalı ve Ark.2003. (313 suş)*	21	25	77				61			27			
[118] Kiremitçi ve Ark. 2003. (38 suş)**	48		33	38		76	50	58		43	69	69	33
[119] Ardıç ve Ark.2003. (150 suş)**	29	26	40		29	47	40		43	34	65	59	
[105] Gültekin ve Ark.2002-2003. (87 suş)	11		18			13	7	18		2	14	3	10
[120] Gündüz ve Ark.2004. (136 suş)										4	41	9	6
[121] Pullukçu ve Ark.2004 (90 suş)**	24	26	28	11		26	24		33	14			30

Tablo 19.(Devam) Türkiye 'de yapılmış çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa* suşlarının antimikrobiyallere direnç oranları(%)

Kaynak/Yıl/Suş Sayısı	IMP	MEM	CAZ	FEP	SCF	ATM	CIP	PRL	TZP	AK	GM	TOB	NET
[98]Yücel ve Ark. 2003-2005 (265 suş)**	31		40	34		35	30		29	26	42		
[122]Güven ve Ark.2005. (161 suş)	34		35	35		38	39	44	38	34	54		
[123]Ekşi ve Ark.2005 (51 suş)	18		27	26		55	20	22	8		31		
[124]Fidan ve Ark.2005. (40 suş)	15	20	23		23		15		25	18			
[102]Kurtoğlu ve Ark. 2006. (130 suş)	50		34			36	33	27			75	65	
[103]Kireççi ve Ark.2006. (92 suş)	14		15			12	9			3	16	8	11
[125]Gayyurhan ve Ark.2007. (89 suş)**	20	21	53	43	38	54	42		43	21	51		
[101]Özdemir ve Ark. 2008. (159 suş)*	54		36	43	32	48	44	23		24	52		38
[107]Eyigör ve Ark. 2008. (94 suş)**	10		20	29		28	21	11		8	18		
[108]Dündar ve Ark. 2005-2007. (665 suş)	22	21	34	31	34	55	34	33	29	20	28	23	
[99]Tunçoğlu ve Ark.2005-2008. (179 suş)	8	10	23	39		45	23	18		6	16		
Bu çalışma. 2009.(110 suş)*	25	17	3	4	11	21	8	6	6	6	12	10	32

IMP:İmipenem, MEM:Meropenem, CAZ:Seftazidim, FEP: Sefepim, SCF:Sefoperazon/Sulbaktam, ATM:Aztreonam, CIP:Siprofloksasin, PRL: Piperasilin, TZP:Piperasilin/Tazobaktam, AK:Amikasin , GM:Gentamisin, TOB: Tobramisin, NET:Netilmisin

*Hastane enfeksiyonu etkeni tanısı almış izolatlar

**Sadece yatan hastaların örneklerinden izole edilmiş suşlar

Ancak tabloda yer alan çalışmalardan sadece dördünde nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan *P. aeruginosa* suşları çalışılmıştır. Altı çalışmada yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen suşlar çalışmaya alınmış, ancak hastane enfeksiyonu etkeni olup olmadıkları değerlendirilmemiştir. Geriye kalan 11 çalışmada ise yatan hasta, poliklinik hastası ayırımı yapılmaksızın laboratuara gelen klinik örneklerden izole edilmiş tüm *P. aeruginosa* izolatları çalışmaya alınmıştır. Bizim çalışmamız hariç, Tablo 19'da yer alan 20 çalışmadaki antibiyotik direnç oranları incelediğinde imipenem

direnci % 8–54, meropenem direnci % 10–37, seftazidim direnci % 15–77, sefepim direnci % 11–46, sefoperazon/sulbaktam direnci % 23–41, aztreonam direnci % 12–76, siprofloksasin direnci % 7–61, piperasilin/tazobaktam direnci % 8–43, piperasilin direnci % 11–58, amikasin direnci % 2–43, gentamisin direnci % 14–75, tobramisin direnci % 3–69, netilmisin direnci % 6–41 olarak görülmektedir.

Hastanemizde yapılan çalışmalardan Durmaz ve ark.nın 1999 yılındaki çalışmasında yoğun bakım ünitelerinden hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilmiş *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim direnci % 12; piperasilin % 57,9; amikasin % 15,8 ve gentamisin direnci % 36,8 olarak bildirilmiştir [126]. Ersoy ve ark.nın 2002 yılındaki çalışmasında hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilmiş 24 *Pseudomonas* suşu için imipenem direnci % 12,5; seftazidim % 50; siprofloksasin % 25; aztreonam % 50; amikasin % 50 ve gentamisin direnci % 67 olarak rapor edilmiştir [127]. Yoğun bakım ünitelerimizde 2007 yılındaki hastane infeksiyonu etkenlerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, 67 *Pseudomonas* izolatında imipeneme % 20; meropeneme % 27,3; seftazidime % 21,3; sefepime % 41,3; sefotaksime % 85,2; aztreonama % 45,9; piperasilin/tazobaktama % 12,7; siprofloksasine % 18,5; amikasine % 7,6 ve gentamisine % 30,2 oranında direnç saptanmıştır [96].

Türkiye’de ve hastanemizde yapılan çalışmalardaki *P. aeruginosa* ve *Pseudomonas* spp. antimikrobiyal direnç oranları Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20. Türkiye’de ve hastanemizde yapılan çalışmalardaki *P. aeruginosa* ve *Pseudomonas* spp. antimikrobiyal direnç oranları (%)

Kaynak/Yıl	IMP	MEM	CAZ	FEP	SCF	ATM	CIP	PRL	TZP	AK	GM	TOB	NET
<i>Türkiye’de yapılan 20 çalışma 1999-2008**</i>	8-54	10-37	15-77	11-46	23-41	12-76	7-61	11-58	8-43	2-43	14-75	3-69	6-41
<i>Durmaz ve Ark. 1999**</i>			12					58		16	37		
<i>Ersoy ve Ark. 2002*</i>	13		50			50	25			50	67		
<i>Mansur ve Ark. 2007*</i>	20	27	21	41		46	19		13	8	30		
<i>Bu çalışma 2009**</i>	25	17	3	4	11	21	8	6	6	6	12	10	32

IMP:İmipenem, MEM:Meropenem, CAZ:Seftazidim, FEP: Sefepim, SCF:Sefoperazon/Sulbaktam, ATM:Aztreonam, CIP:Siprofloksasin, PRL: Piperasilin, TZP:Piperasilin/Tazobaktam, AK:Amikasin , GM:Gentamisin, TOB: Tobramisin, NET:Netilmisin

**Pseudomonas* spp. direnç oranları ** *P. aeruginosa*. direnç oranları

Hastanemizde yapılan 2002 yılındaki çalışmada sadece 24 izolat yer almaktadır ki, bu durum istatistiksel açıdan direnç oranlarının hesaplanmasında birkaç izolatın yüzde değerlerini anlamlı oranda değiştirebilmesine neden olmaktadır. Tobramisin, netilmisin, sefoperazon/sulbaktam duyarlılık testleri önceki üç çalışmanın hiçbirinde yer almamaktadır. Meropenem, sefepim ve piperasilin/tazobaktam direnç oranları ise sadece 2007 yılındaki çalışmada mevcuttur.

Yurt dışında yapılmış çalışmalarda karbapenemlere direnç oranı % 3,9–50,5 arasındadır. Türkiye’de yapılmış çalışmalarda ise imipenem direnç oranı % 8–54; meropenem direnç oranı % 10–37 aralığındadır. EARSS 2009 Türkiye verilerinde *P. aeruginosa* için karbapenem direnç oranı % 27,8’dir. Bizim çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarının imipenem ve meropenem direnç oranları sırasıyla; % 25 ve % 17 olarak bulunmuştur. Bu oranlar yurtiçi ve yurtdışı verilerin çoğu ile benzer olup, Türkiye ortalamasının biraz daha altındadır. İmipenem direncinin meropenem direncine göre daha yüksek olmasında hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının ampirik tedavisinde imipenemin daha fazla kullanılmasının etkili olabileceği düşünülmüştür.

P. aeruginosa için seftazidim direnç oranları yurtdışı çalışmalarda % 4–44,8; Türkiye’deki çalışmalarda % 15–77 aralığındadır. Çalışmamızda seftazidim direnç oranı % 3 olarak bulunmuş olup, bu değer seftazidimin terapötik kullanımı açısından yüz güldürücüdür.

Sefepim direnç oranı ABD’de yapılmış kapsamlı bir çalışmada % 10 olarak bildirilmiştir [109]. Türkiye’de yapılmış çalışmalarda sefepim direnç oranı % 11–46 aralığında olup, bizim çalışmamızda % 4 olarak saptanmıştır. Hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde seftazidim veya sefepimin bir diğer antipseudomonal ilaç grubu ile kombine edilerek kullanımı etkili bir ampirik tedavi seçeneği olarak gözönünde bulundurulmalıdır.

P. aeruginosa suşları için aztreonam direnci ile ilgili gerek Avrupa gerekse ABD’de yapılan çalışmaların çoğunda direnç ya da duyarlılık oranı bildirilmemiştir. Sadece Eldere ve ark.nın çalışmasında *P. aeruginosa* için aztreonama direnç oranı % 55,5 olarak bildirilmiştir [97]. Türkiye’de yapılmış çalışmalarda aztreonama direnç oranı % 12-76 arasında değişmektedir(bkz. Tablo 19). Hastanemizde 2002 ve 2007 yıllarında *Pseudomonas* suşları için aztreonam direnç oranları sırasıyla % 50 ve % 46 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatları aztreonama % 21 oranında dirençli bulunmuştur. Bu verilere göre hastanemizde *P. aeruginosa* suşları için aztreonama direnç oranında anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir($p<0,001$).

Aztreonamın hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde son yıllarda tercih edilmemesinin bu düşüşte etkili olabileceği söylenebilir.

P. aeruginosa suşlarında kinolon direnci yurtdışında yapılmış çalışmalarda % 7,2–42,7 arasında olup, bu oran EARSS 2009 Türkiye verilerinde % 29,3 olarak bildirilmiştir. Türkiye genelinde yapılmış çalışmalarda siprofloksasin direnci % 7–61 arasında değişmektedir (bkz.Tablo 19). Çalışmamızda siprofloksasine direnç oranı % 8 olarak saptanmış olup, bu düşük direnç oranının hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde dikkate alınması gerektiği düşünülmüştür.

Yurtdışında yapılmış çalışmalarda piperasilin ve piperasilin/tazobaktama direnç oranları % 3,1–48,5 arasında olup, EARSS 2009 Türkiye verilerinde % 26,1 olarak bildirilmiştir. Türkiye’de yapılmış çalışmalarda ise piperasiline % 11–58; piperasilin/tazobaktama % 8–43 arasında direnç rapor edilmiştir. Hastanemizde 1999 yılında yapılan çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarındaki piperasilin direnci % 58, 2007 yılında yapılan çalışmada ise *Pseudomonas* suşları için piperasilin/tazobaktam direnci % 13 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda piperasilin ve piperasilin/tazobaktama direnç oranları % 6 olarak saptanmıştır. Hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde piperasilinler sık kullanılmalarına rağmen, piperasilin ve piperasilin/tazobaktam direncinde bir artış söz konusu değildir. Aksine direnç oranlarında düşme olduğu görülmektedir. Bu düşüşte hastanemizde piperasilin/tazobaktamın genellikle bir diğer antipseudomonal ilaç grubu ile kombine kullanımının etkili olabileceği düşüncesindeyiz.

Yurt dışında yapılmış çalışmalarda *P. aeruginosa* suşlarında aminoglikozidlere direnç oranı % 0–51,9 arasında olup, EARSS Türkiye verilerinde 2006-2009 yılları arasındaki dört yıllık direnç oranları sırasıyla; %33,7; % 28,2; % 22,5; % 15,4 şeklinde rapor edilmiştir. EARSS verilerine göre Türkiye’de *P. aeruginosa* suşlarının aminoglikozidlere direnç oranlarında düşme görülmektedir. Türkiye’de yapılmış çalışmalarda amikasin direnci % 2–43; gentamisin direnci % 14–75; tobramisin direnci % 3–69; netilmisin direnci % 6–41 arasında değişmektedir. Çalışmamızda amikasin, gentamisin, tobramisin ve netilmisine direnç oranları sırasıyla; % 6; % 12; % 10; % 32 olarak bulunmuştur. Amikasin direnç oranı en düşük, netilmisin ise direnç oranı en yüksek aminoglikozidler olarak dikkati çekmektedir.

P. aeruginosa suşlarında İBL enzimi üretimi tedavi sırasında hızla çoklu beta laktam antibiyotik direncine neden olmakta, böylece dereprese mutantların hastane içinde yayılmasına ve nozokomiyal infeksiyonlara yol açmaktadır. Standart infeksiyon

kontrol önlemlerinin yanı sıra akılcı antibiyotik kullanım politikalarının belirlenmesine katkı sağlayacak olan İBL salgılama oranlarının bilinmesi önemlidir. Basit tarama testleri ile İBL pozitif bulunan *P. aeruginosa* izolatlarının etken oldukları infeksiyonların tedavisinde tek başına 3. kuşak sefalosporinlerin ve monobaktamların kullanımından kaçınılmalıdır. Aksi takdirde indükleyici etki ile karbapenemler dışında tüm beta laktam antibiyotiklere direnç gelişebileceği konusunda klinisyenler bilgilendirilmelidir [33;48-50].

P. aeruginosa suşlarındaki İBL üretim oranları ülkelere, hastanelere ve hatta ünitelere göre değişebilmektedir. Türkiye’de yapılmış çalışmalarda *P.aeruginosa* suşlarındaki İBL oranları % 30,7-82 olarak bildirilmiş olup, detaylar Tablo 21’de gösterilmiştir.

Tablo 21. Türkiye’de yapılmış çalışmalarda İBL pozitif *P. aeruginosa* oranları

Kaynak/Yıl/Çalışılan suş sayısı	İBL pozitif suş oranı(%)
[128]Gülay ve Ark.1996.(150 suş)	61,3
[129]Fincancı ve Ark.2000.(73 suş)	59
[130]Şener ve Ark.2001.(58 suş)	55,1
[131]Özgenç ve Ark.2002.(199 suş)	77
[132]Kandemir ve Ark.2002.(13 suş)	30,7
[114]Gencer ve Ark.2002.(65 suş)	53
[133]Oldacay ve Ark.2003.(150 suş)	60
[134]Küçükateş veArk.2007.(79 suş)	40,5
[135]Çelik ve Ark. 2007. (50 suş)	82
[123]Ekşi ve Ark. 2007. (51 suş)	52,9
Bu çalışma.2009.(110 suş)	90

Hastanemizde daha önceki yıllarda, İBL salgılayan *P. aeruginosa* suşlarının görülme sıklığıyla ilgili araştırma yapılmamıştır. Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* izolatlarının % 90’ında saptadığımız İBL pozitifliği bu konudaki ilk veri olup, oran Türkiye’de yapılmış diğer çalışmalarda verilen oranlardan yüksek bulunmuştur. Hastanemizdeki yüksek İBL pozitiflik oranı nedeniyle klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşları için İBL üretimi laboratuvar tarafından belirtilmemiş olsa bile, izolatların bu özellikte olduğu kabul edilmelidir. *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisi sırasında, kullanılan antimikrobiyal ilaca direnç gelişebileceğinden bu suşların antibiyogramlarının 3-4 günlük tedaviden sonra tekrarlanması uygun olacaktır.

Karbapenemlerin *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde yoğun olarak kullanılması son yıllarda bu antibiyotiklere karşı direncin artmasına yol açmıştır. *P. aeruginosa*'da düşük düzey karbapenem direnci OprD porin proteini kaybı, aktif eflüks pompa sistemleri ve İBL salgılayan dereprese mutantların oluşumu gibi birkaç faktörün bir arada bulunmasıyla mümkündür. Ambler moleküler sınıf B grubu MBL enzimleri ise yüksek düzeyde karbapenem direncinden sorumludur ve klinik yönden en önemli karbapenemazlardır. Karbapenemaz üretimi genellikle karbapenemlerin yanı sıra diğer beta laktam antibiyotiklere de dirence neden olmaktadır. Sadece monobaktamlar, MBL'ların hidrolitik özelliklerinden etkilenmeyebilirler. IMP, VIM, SPM ve GIM tipi MBL'lar *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır. *P. aeruginosa*'da VIM-2 şu an dünyada en yaygın olan MBL enzimidir. [33;43;47;57-59].

MBL üreten bakteriler ile oluşan infeksiyonlarda bu direncin saptanması ve yayılmasının kontrol edilmesi gerekmektedir. Bunun için rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek hızlı, güvenilir ve maliyet etkin fenotipik testlere ihtiyaç vardır. Fakat *P. aeruginosa*'da MBL saptanması için henüz CLSI'nin önerdiği standart bir tarama testi bulunmamaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MBL enzimi salgılayan bakterilerin tanımlanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Modifiye Hodge testi, imipenem/EDTA Kombine disk testi, imipenem-EDTA çift disk sinerji testi MBL saptanmasında kullanılan basit tarama testleridir. Bu testlerden başka sonuçları PZR ile doğrulanmış olan MBL E test tarama yöntemleri de kullanılmaktadır. Duyarlılık ve özgüllük oranı çok yüksek olsa da, bugün için sayıları artmış olan MBL subtiplerini PZR ile saptamak efektif olmamaktadır [69;84-90].

Modifiye Hodge testini geliştiren Lee ve ark.nın 2001 yılındaki çalışmasında PZR ile *blaVIM-2* geni pozitif bulunmuş olan 493 *P. aeruginosa* klinik izolatında modifiye Hodge testi % 100 duyarlılık ve % 88 özgüllükte bulunmuştur [92]. Lee ve ark. 2003 yılında *blaIMP-1* veya *blaVIM-2* geni pozitif 39 *P. aeruginosa* klinik izolatında modifiye Hodge testinin performansını değerlendirmişlerdir. Yirmialtı pozitif, 10 şüpheli ve 3 negatif sonuç elde etmişler ve testin duyarlılığında düşme saptamışlardır [86]. Aynı araştırmacıların 2008 yılındaki çalışmasında ise, imipeneme dirençli 415 klinik *P. aeruginosa* izolatında MBL direnç genleri PZR ile araştırılmış ve 45 izolatta MBL geni saptanmıştır. Ancak çalışmada tarama testi olarak modifiye Hodge testi kullanıldığında 117 izolatta MBL pozitif sonuç alındığı bildirilmiştir [136].

P. aeruginosa suşlarında MBL enzimi tarama testi olarak modifiye Hodge testinin kullanıldığı çalışmalar çok az sayıdadır. Bu çalışmalarda genellikle Lee ve

ark.nın[92] 2001 yılında uyguladıkları yöntem referans olarak alınmış ve çalışmaların hiçbirinde modifiye Hodge testi sonuçları genotipik olarak doğrulanmamıştır. Modifiye Hodge testi için aynı araştırmacıların farklı bulguları ve yöntemi tekrar modifiye etme çalışmaları nedeniyle *P. aeruginosa* suşlarında testin güvenilirliği tartışmalıdır. Türkiye’de MBL enzimi tarama testi olarak modifiye Hodge testinin kullanıldığı çalışmalarda da imipenem diskinde EDTA ilave edilerek MHA besiyerleri kullanılmıştır.

Fidan ark.nın yaptıkları çalışmada 40 *P. aeruginosa* izolatından ikisi(% 5) modifiye Hodge testi ve çift disk sinerji testi ile pozitif sonuç vermiş, iki testin uyumlu olduğu bildirilmiştir [124].

Tetik Isparta’da 2008 yılında yaptığı çalışmada imipeneme dirençli 52 *P.aeruginosa* izolatının 30’unda(% 58) modifiye Hodge testi ile MBL pozitifliği saptamıştır. Aynı çalışmada Kombine disk metodu ile % 62, IMP-EDTA çift disk sinerji testi ile % 73 ve E test ile % 40 oranında MBL pozitifliği saptanmıştır [137].

Dede İstanbul’da 2006 yılında imipeneme dirençli 63 *P. aeruginosa* izolatında modifiye Hodge testi ve imipenem/EDTA Kombine disk testi ile MBL enzim üretimini araştırmış, ancak her iki test ile de MBL pozitifliği saptanmamıştır [138].

Bizim çalışmamızda imipenem ve/veya meropeneme dirençli 29 izolatta MBL üretimini belirlemek için üç fenotipik yöntem çalışılmıştır. Bu yöntemlerden modifiye Hodge testi diğer iki fenotipik yöntem olan imipenem/EDTA Kombine disk testi ve MBL E testten oldukça farklı sonuçlar vermiştir. Modifiye Hodge testinin değerlendirilmesi sırasında negatif kontrol olarak çalışılan *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun şüpheli pozitiflik vermesi ve testin tekrarında da pozitif olarak değerlendirilmesiyle test sonuçlarının güvenilirliği sorgulanmış ve MBL üreten suşların belirlenmesinde modifiye Hodge testi sonuçları dikkate alınmamıştır.

Çalışmamızda kullandığımız ikinci fenotipik yöntem MBL E testtir. Gerek çalışma kolaylığı, gerek MİK değerleri ile sayısal sonuç vermesi ve yorumlanma kolaylığı nedeniyle MBL E test ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır.

MBL E testle ilgili ilk referans çalışma Walsh ve ark. tarafından 2002 yılında ABD’de yapılan çalışmadır. Çalışmada *P. aeruginosa*’dan başka *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia* spp., ve *Bacteroides fragilis* izolatlarında da IMP/EDTA ve CAZ/MPA E test yöntemleri çalışılmıştır. Toplam 130 izolatta genotipik yöntemler ve E test yöntemleri ile MBL üretimi araştırılmış ve 83 izolatta genotipik yöntemler ile MBL geni pozitif bulunmuştur. IP/IPI E testin duyarlılığı % 94, özgüllüğü % 95 olarak bildirilmiştir. Çalışılan 14 *P. aeruginosa* izolatından birinde PZR ile

blaIMP-1 geni pozitif olarak bulunmuş, IP/IPI E test ile de aynı izolat pozitif, diğer 13 izolat ise negatif sonuç vermiştir. *P. aeruginosa* için IP/IPI E testin duyarlılık ve özgüllüğü % 100 olarak bildirilmiştir. Çalışmada imipenemin seftazidime ve EDTA'nın MPA'ye göre genel olarak çok daha doğru sonuçlar verdiği vurgulanmıştır. Yine aynı çalışmada IP/IPI E test için MHA besiyeri önerilmiş, farklı MHA besiyeri markalarının IP/IPI E test sonuçlarını etkileyebileceğine dikkat çekilmiştir. Çalışmada beş farklı marka MHA besiyeri MBL E test sonuçları açısından test edilmiş, dört besiyerinde kabul edilebilir sonuçlar alınmış ancak bir besiyerinde hatalı pozitiflik oranı yüksek bulunmuştur. Bunun besiyeri içeriğine bağlı olarak, IMP MİK değerlerinin düşük; IMP/EDTA MİK değerlerinin ise çok daha fazla düşük (hatalı olarak ≥ 8 kat farka yol açar) olarak ölçülmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [84].

Lee ve ark. MBL geni taşımayan 23 *P. aeruginosa* izolatında, *blaIMP-1* geni pozitif bir *P. aeruginosa* izolatında ve *blaVIM-2* geni pozitif 102 *P. aeruginosa* izolatında IP/IPI E testin performansını değerlendirmişlerdir. IP/IPI E test ile *blaIMP-1* geni taşıyan izolat pozitif sonuç vermiştir. *blaVIM-2* geni taşıyan 102 *P. aeruginosa* izolatının 101'inde sonuç pozitif, MBL geni taşımayan 23 izolatın 22'sinde ise sonuç negatif bulunmuştur. Çalışmada IP/IPI E testin duyarlılığı % 99 ve özgüllüğü % 95,7 olarak saptanmış olup; IMP-1 ve VIM-2 üreten *P. aeruginosa* izolatlarında MBL tespiti için E testin güvenilir olduğu bildirilmiştir [87].

Marchiaro ve Ark. altısı MBL geni pozitif(*blaIMP*, *blaVIM* ve *blaSPM-1*) olmak üzere toplam 56 *P. aeruginosa* izolatında IP/IPI E test çalışmışlardır. E test sonucunda MBL geni taşıyan altı izolatın beşi pozitif, MBL geni taşımayan 50 izolatın tamamı negatif bulunmuştur. IP/IPI E testin duyarlılığı % 83,3; özgüllüğü % 100 olarak rapor edilmiştir [139].

Wang ve ark.nın çalışmasında karbapenemlere dirençli 258 *P. aeruginosa* izolatında PZR ve DNA sekans analizi ile MBL geni araştırılmış ve aynı zamanda IP/IPI E test çalışılmıştır. Yirmi iki izolatta MBL geni pozitif(*blaIMP-1*, *blaIMP-9* ve *blaVIM-2*) bulunmuş olup, IP/IPI E test bu izolatların 19'unu saptayabilmiştir. MBL geni negatif bulunan 238 izolatın tamamında IP/IPI E test sonuçları da negatif bulunmuştur. Çalışmada IP/IPI E testin duyarlılığı % 86,3; özgüllüğü % 100 olarak bildirilmiştir [140].

MBL enzim üretimini belirlemek için kullandığımız üçüncü fenotipik test olan IMP/EDTA Kombine disk testi, 2002 yılında Yong ve ark. tarafından çift disk sinerji testlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. PZR ile *blaIMP-1* geni veya *blaVIM-2* geni

pozitif bulunan 102 *P. aeruginosa* izolatında IMP/EDTA Kombine disk testi çalışılmış, testin duyarlılığı ve özgüllüğü % 100 olarak bildirilmiştir [90].

Yan ve ark.nın çalışmasında MBL geni pozitif olan 22 *Pseudomonas* suşunda(onbiri *P. aeruginosa*) IMP/EDTA Kombine disk testi ve IP/IPI E test çalışılmış ve suşların 19'unda her iki test ile sonuç pozitif bulunmuştur. Testlerin duyarlılığı % 86,4 özgüllüğü ise % 100 olarak saptanmıştır. E testin imipeneme duyarlı(MİK $\leq$ 4 μ g/ml) suşlarda MBL üretimini saptayamadığı özellikle vurgulanmıştır [89].

Samuelsen ve ark. karbapenemlere dirençli 60 *P. aeruginosa* izolatında ve MBL pozitif kontrol suşlarında IMP/EDTA Kombine disk testini çalışmışlardır. Altmış izolattan ikisi genotipik olarak MBL pozitif bulunmuş, bu iki suş ve pozitif kontrol amaçlı çalışılan yedi suş(VIM-1, VIM-2, VIM-7, IMP-16, GIM-1 ve SPM-1) Kombine disk testi ve IP/IPI E test ile pozitif sonuç vermiştir. Kombine disk testi 58 MBL negatif suşun beşinde hatalı pozitif sonuç vermiştir. IMP/EDTA Kombine disk testinin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 91 olarak saptanmıştır. IP/IPI E test 58 MBL negatif suşun sekizinde hatalı pozitif sonuç vermiş, bu testin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 86 olarak saptanmıştır. Çalışmada, MBL taraması çalışılacak suşlar için imipenem direncine ilaveten seftazidime direncin de tarama kriterlerine eklenmesinin, hatalı pozitif sonuçları azaltarak; testin özgüllüğünü artıracığı belirtilmiştir [141].

Pitout ve ark.nın çalışmasında; imipeneme duyarlı olmayan 241 *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya alınmış, bunların 107'sinde *bla*IMP ve *bla*VIM geni saptanmıştır. IMP/EDTA Kombine disk testi ve IP/IPI E test ile MBL pozitif 107 izolatın 103'ü saptanabilmiştir. Genotipik olarak MBL negatif 134 izolatın 12'sinde her iki testle hatalı pozitif sonuç alınmıştır(% 96 duyarlılık ve % 91 özgüllük). IMP/EDTA Kombine disk testi sonuçları ile IP/IPI E test sonuçları arasında % 100 uyum saptanmıştır. Meropenem/EDTA kombinasyonu ile çalışılan Kombine disk testinde ise; MBL üreten 107 izolatın tamamı pozitif sonuç vermiş, MBL üretmeyen 134 izolatın dördünde ise hatalı pozitif sonuç alınmıştır (% 100 duyarlılık ve % 97 özgüllük) [142].

Qu ve ark.nın çalışmasında imipeneme duyarlı olmayan 264 *P. aeruginosa* izolatında PZR ve nükleotid sekans analizi ile MBL geni araştırılmış, 24 izolatta (bir izolat *bla*IMP-1, 13 izolat *bla*IMP-9 ve 10 izolat *bla*VIM-2) pozitif sonuç elde edilmiştir. Kombine disk testinin pozitifliği için IMP ve IMP/EDTA disk zon çapları arasındaki farkı ≥ 6 mm pozitif kabul ederek, testin duyarlılık, özgüllüğünü % 100 olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada Yong ve ark.nın[90] değerlendirme kriteri olan ≥ 7 mm pozitif değerine göre; testin duyarlılığı % 90,5; özgüllüğü % 100 olarak

bildirilmiştir. Çalışmada 24 izolattan 18'i IP/IPI E test ile pozitif sonuç vermiş olup, MBL geni taşımayan 240 izolatın tamamında E test sonuçları negatif bulunmuştur (Duyarlılık % 75 ve özgüllük % 100) [143].

Andrade ve ark.nın çalışmasında; Kombine disk testi için pek çok beta laktam antibiyotik MBL inhibitörleri ile kombine edilerek çalışılmış; sadece IMP/EDTA kombinasyonu ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Önceden hazırlanarak +4 °C'de muhafaza edilen diskler ile test sırasında EDTA eklenen disklerin zon çapları arasında fark saptanmadığı bildirilmiştir [144].

Bahar ve ark.nın çalışmasında imipeneme dirençli 115 *P. aeruginosa* izolatına MBL tarama testi olarak IMP/EDTA kombine disk testi çalışılmış, 23 izolat MBL pozitif bulunmuş olup; PZR ile bu 23 izolatın tamamında *blaVIM* geni saptanmıştır [145].

Çalışmalarda yer alan IMP/EDTA Kombine disk testi ve IP/IPI E test sonuçlarının duyarlılık ve özgüllük oranları Tablo 22 ve Tablo 23'de gösterilmiştir.

Tablo 22. *P. aeruginosa* izolatlarında imipenem/EDTA Kombine disk testi duyarlılık ve özgüllük oranları

Kaynak /EDTA miktarı /Pozitiflik sınır değeri	Duyarlılık(%)	Özgüllük (%)
[90]Yong ve Ark./ 750µg/ ≥ 7 mm	100	100
[89]Yan ve Ark./ 750µg/ ≥ 7 mm	86,4	96
[141]Samuelsen ve Ark./ 750µg/ ≥ 7 mm	100	91
[142]Pitout ve Ark./ 930µg/ ≥ 7 mm	96	91
[143]Qu ve Ark./ 750µg/ ≥ 7 mm	90,5	100
≥ 6 mm	100	100

Tablo 23. *P. aeruginosa* izolatlarında MBL(IP/IPI) E test duyarlılık ve özgüllük oranları

Kaynak	Duyarlılık(%)	Özgüllük (%)
[84] Walsh ve Ark	100	100
[89] Yan ve Ark	86,4	100
[87] Lee ve Ark	99	95,7
[141]Samuelsen ve Ark	100	86
[142]Pitout ve Ark	96	91
[143]Qu ve Ark.	75	100
[140]Wang ve Ark	86,3	100
[139]Marchiaro ve Ark	83,3	100

Ülkemizde *P. aeruginosa* suşları için MBL oranları çeşitli fenotipik yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Ancak moleküler yöntemler ile MBL geni saptamaya yönelik çalışmalar az sayıdadır.

Bahar ve ark. 2003 yılında Ankara’da 53 yaşında bir hastadan izole ettikleri, ancak infeksiyon etkeni olarak düşünmedikleri bir *P. aeruginosa* izolatında *bla*VIM-5 geni saptamışlardır. Bu MBL üreten *P. aeruginosa* izolatı olarak Türkiye’den yapılan ilk bildirimdir. MBL pozitif izolat karbapenemlerin yanı sıra sefalosporinlere, aztreonama, piperasiline, siprofloksasine ve aminoglikozidlere dirençli bulunmuştur. VIM-5 üreten bu izolat IP/IPI E test ile de pozitif sonuç vermiştir. Çalışmada daha önce Türkiye’den bildirilmiş VIM-5 enzimi üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarına dikkat çekilerek, MBL enzimlerinin Gram negatif patojenler arasındaki yayılma potansiyeli vurgulanmıştır [146].

Özgümüş ve ark. 2007 yılında Rize’de yaptıkları çalışmada PZR yöntemi ile 10 *P. aeruginosa* izolatında *bla*VIM geni(bir izolatta) ve *bla*IMP-1(dokuz izolatta) geni saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada IP/IPI E test IMP-1 geni taşıyan izolatların sadece dördünde pozitif sonuç vermiştir. Piperasilin/tazobaktam izolatlara etkili tek antibiyotik olarak bildirilmiştir [147].

Yakupoğulları ve ark.nın 2006 yılında Elazığ’da yaptıkları çalışmada, iki yaşında kistik fibrozisli bir hastadan izole edilen ve IP/IPI E test ile pozitif sonuç alınan *P.aeruginosa* suşunda *bla*VIM-2 geni saptanmıştır. İzolat siprofloksasin ve kolistin dışındaki antibiyotiklere dirençli olarak bildirilmiştir [148].

Bayraktar ve ark.nın çalışmasında yoğun bakım ünitesinden izole edilen 27 *P.aeruginosa* suşundan 17’sinde(% 63) IP/IPI E test ile MBL pozitif olarak bulunmuştur. Suşların çoğunlukla diğer beta laktam antibiyotiklere de dirençli olduğu saptanmıştır [149].

Toraman ve ark.nın çalışmasında karbapenemlere dirençli 42 *Pseudomonas* suşunda IP/IPI E test çalışılmış ve 10 *P. aeruginosa*(% 24) suşunda MBL pozitif bulunmuştur [150].

Cesur ve ark. Türkiye’de yedi farklı coğrafi bölgeyi temsil eden Ankara, Konya, Antalya, İstanbul, İzmir, Diyarbakır, Van olmak üzere sekiz ilden toplam 186 karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* suşunda MBL varlığını IMP/EDTA Kombine disk testi ile araştırmışlardır. Suşların % 31,2’sinde (58/186) MBL pozitif bulunmuştur. MBL oranlarının iller arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (p< 0,05) [151].

Çalışmamızda imipeneme ve/veya meropeneme duyarlı olmayan 29 izolata IMP/EDTA Kombine disk testi ve IP/IPI E test çalışılmıştır. Kombine disk testi ile altı izolatta, IP/IPI E test ile de iki izolatta pozitif sonuç bulunmuştur. IP/IPI E test ile

pozitif sonuç veren iki izolat Kombine disk testi ile de pozitif sonuç vermiştir. Tablo 23'teki çalışmalar incelendiğinde IP/IPI E testin duyarlılığı % 75–100; özgüllüğü ise % 86–100 arasında değişmektedir. IMP/EDTA Kombine disk testi ile yapılan çalışmalarda duyarlılık oranları % 86,4–100; özgüllük oranları % 91–100 arasında değişmektedir (bkz. Tablo 22). Testlerin özgüllük oranları dikkate alındığında, MBL tarama testlerini çalıştığımız 29 izolat arasında IP/IPI E test ve Kombine disk testi sonucu negatif olan 23 izolatın MBL aktivitesine sahip olma ihtimalleri çok düşüktür.

Testlerin duyarlılık oranları dikkate alınarak çalışmamızda MBL E test ve Kombine disk testinin her ikisiyle de pozitif sonuç veren iki izolat, MBL enzimi üreten izolatlar olarak kabul edilmiştir. Buna göre karbapenemlere dirençli 29 *P. aeruginosa* izolatı içerisinde MBL üreten izolatların oranı % 7(2/29) olarak bulunmuştur. Çalışılan 110 *P. aeruginosa* izolatı içerisinde MBL üretenlerin oranı ise % 1,8(2/110) olarak belirlenmiştir.

MBL taramasında negatif sonuç alınan *P. aeruginosa* izolatlarında muhtemelen OprD porin proteini kaybı sonucu karbapenem direnci ortaya çıkmakta, buna bağlı olarak imipenem direnç yanında meropenem azalmış duyarlılık gözlenmektedir. Meropenem ve diğer beta laktam antibiyotiklerin farklı kanallardan dış membranı geçebilmesi azalmış duyarlılığı açıklar niteliktedir. Ayrıca OprD porin proteini kaybına bağlı olarak karbapenem direnci gelişimi sadece kromozomal AmpC tipi beta-laktamaz(İBL) üreten suşlarda görülmekte olup, bu iki direnç mekanizması arasında yakın ilişki vardır [16;30-34]. Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* izolatlarının % 90'ı İBL pozitif olduğundan izole karbapenem direnci bu iki mekanizmanın birlikteliğine bağlı olabilir. Yine karbapenemler dahil çoklu ilaç direncine sahip ancak, MBL negatif olarak bulunan izolatlarda OprD porin proteini kaybıyla birlikte efluks pompa sistemlerinin dirençten sorumlu olabileceği söylenebilir.

MBL pozitif 1 no'lu izolat imipenem, meropenem, sefotaksim, aztreonam, netilmisine dirençli olup; 2 no'lu izolat ise imipenem, meropenem, sefotaksim ve netilmisine dirençli bulunmuştur(bkz. Tablo 16). Her iki izolatın da seftazidim, sefepim, piperasilinler, siprofloksasin, amikasin, gentamisin ve tobramisine duyarlı oluşları şaşırtıcıdır. Mutlak bir kural olmamakla birlikte, MBL üreten suşlarda aztreonam dışındaki tüm beta laktam antibiyotiklere direnç oluşması beklenmektedir. Ayrıca MBL enzimini kodlayan gen kasetlerinin bulunduğu class 1 integronlarda genellikle aminoglikozid direncini kodlayan aacA4 geni de bulunduğundan sıklıkla aminoglikozid grubu antibiyotiklere de direnç gelişebilmektedir [75-78].

Hastanemizdeki nozokomiyal *P. aeruginosa* izolatlarında MBL pozitiflik oranının belirlenmesi ve IP/IPI E teste göre çok daha düşük maliyetli olan IMP/EDTA Kombine disk testinin rutin laboratuvarda MBL taraması amacıyla kullanılabilirliğini ortaya koymak bu çalışmanın amaçları arasındadır. Çalışmamızda IMP/EDTA Kombine disk testinin E test gibi kolay uygulanabilen, kolay yorumlanabilen, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir fenotipik tarama testi olduğu ve IMP/EDTA Kombine disk testi sonuçlarının IP/IPI E test sonuçlarıyla % 86 oranında uyumlu olduğu saptanmıştır. Rutin laboratuvar çalışmaları sırasında izole edilen karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* suşlarında IMP/EDTA Kombine disk testi çalışılarak, MBL enzimi varlığının saptanması sayesinde infeksiyon kontrol önlemleri hızlı ve etkin olarak uygulanabilir; böylece dirençli suşların seleksiyonu ve direncin diğer Gram negatif bakterilere aktarılması önlenir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda *P. aeruginosa* suşları en sık idrar, trakeal aspirat, kan ve yara örneklerinden izole edilmiştir; en sık neden oldukları infeksiyonlar idrar yolu infeksiyonları ve pnömonidir.
2. Suşların en sık izole edildikleri servisler Reanimasyon Yoğun Bakım ve Dahiliye Yoğun Bakım üniteleri olup, karbapenemlere dirençli suşların da çoğunluğu yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalardan izole edilmiştir. Yoğun bakım üniteleri hastanenin diğer servislerine göre *P. aeruginosa* infeksiyonları açısından daha riskli durumdadır. Bu nedenle yoğun bakım ünitelerinde infeksiyon kontrol önlemlerinin eksiksiz uygulanması, antibiyotik direnç profilinin sürekli izlenmesi ve doğru antibiyotik kullanım politikalarının oluşturulması gerekmektedir.
3. Seftazidim, sefepim, piperasilinler, siprofloksasin, amikasin, gentamisin ve tobramisin *P. aeruginosa* suşlarının en duyarlı oldukları antibiyotikler olarak bulunmuştur. Amikasin direnç oranı en düşük, netilmisin ise direnç oranı en yüksek aminoglikozidler olarak dikkati çekmektedir.
4. Hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının ampirik tedavisinde en çok tercih edilen ilaç grubu olmaları nedeniyle karbapenemlere(özellikle imipeneme) direnç oranı diğer beta laktam antibiyotiklere göre yüksek bulunmuştur.

5. Duyarlılık oranı çok yüksek olan seftazidim, sefepim veya piperasilin/tazobaktamın bir diğer antipseudomonal ilaç grubu ile kombine kullanımının, hastanemizdeki *P. aeruginosa* infeksiyonlarının ampirik tedavisi için iyi bir yaklaşım olabileceği kanısındayız.
6. Çalışmamızdaki *P. aeruginosa* izolatlarının % 90'ında saptadığımız İBL pozitifliği Türkiye'de yapılmış diğer çalışmalardan yüksek bulunmuştur.
7. İBL pozitif bulunmuş izolatların etken oldukları infeksiyonların tedavisinde tek başına 3. kuşak sefalosporinlerin ve monobaktamların kullanımından kaçınılmalıdır. Aksi takdirde indükleyici etki ile karbapenemler dışında tüm beta laktam antibiyotiklere direnç gelişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.
8. Hastanemizdeki yüksek İBL pozitifliği nedeniyle, klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşları için İBL üretimi laboratuvar tarafından belirtilmemiş olsa bile; izolatların bu özellikte olduğu kabul edilmelidir.
9. Yüksek İBL pozitifliği nedeniyle, *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisi sırasında kullanılan antimikrobiyal ilaca direnç gelişebileceğinden; bu suşların antibiyogramlarının 3-4 günlük tedaviden sonra tekrarlanması uygun olacaktır.
10. Çalışmamızda karbapenemlere dirençli izolatlarda MBL üretimini belirlemek için kullandığımız yöntemlerden modifiye Hodge testinin, negatif kontrol için kullanılan standart suşta(*P. aeruginosa* ATCC 27853) pozitif sonuç vermesi ve diğer iki yöntemle göre çok farklı sonuçlar vermesi nedeniyle, rutin laboratuvarımızda MBL tarama testi olarak kullanılması uygun görülmemektedir.
11. Çalışmamızda MBL E test ve Kombine disk testinin her ikisiyle de pozitif sonuç alınan iki izolat, MBL üreten izolatlar olarak kabul edilmiştir. Buna göre karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatları içerisinde, MBL üreten izolatların oranı % 7 olarak bulunmuştur. Çalışılan tüm *P. aeruginosa* izolatları içerisinde MBL üretenlerin oranı ise % 1,8 olarak belirlenmiştir.

- 12.** Çalışmamızdaki karbapenemlere dirençli *P.aeruginosa* izolatları için MBL üretiminin saptanmasında, IMP/EDTA Kombine disk testi ile IP/IPI E test birbirleriyle % 86 oranında uyumlu bulunmuştur.
- 13.** IMP/EDTA Kombine disk testinin IP/IPI E test kadar güvenli, basit, hızlı ve kolay yorumlanabilen, üstelik E teste göre maliyet yönünden çok daha uygun bir test olduğu saptanmıştır. Bu testin rutin laboratuvarımızda izole edilen karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatları için çalışılması MBL pozitif izolatların hızla saptanmasını ve infeksiyon kontrol önlemlerinin etkin olarak uygulanmasını sağlayabilir.

7. ÖZET

TURGUT ÖZAL TIP MERKEZİNDE 2009 YILINDA NOZOKOMİYAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ, İNDÜKLENEBİLİR BETA-LAKTAMAZ VE METALLO BETA-LAKTAMAZ ORANLARININ BELİRLENMESİ

Amaç: Hastane infeksiyonu etkenlerinden olan *Pseudomonas aeruginosa* birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olup, mevcut kullanılabilen antibiyotiklere direnci de hastanelere göre değişebilmektedir. *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere direncinde çeşitli beta-laktamaz enzimleri ve farklı mekanizmalar rol oynamaktadır.

Bu çalışmada nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında çeşitli antibiyotiklere direnç oranlarının, İBL ve MBL üretiminin araştırılması ve MBL üretimini belirlemek için üç farklı fenotipik yöntemin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: *P. aeruginosa* izolatları konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış, antibiyotik duyarlılık testleri CLSI standartlarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Karbapenem direncini doğrulamak için imipenem ve meropenem E test(AB BIODISK, Solna, Sweden) kullanılmıştır. İBL üretimini belirlemek için disk indüksiyon yöntemi kullanılmıştır. MBL üretimini belirlemek için modifiye Hodge testi, imipenem/EDTA Kombine disk testi, MBL E test kullanılarak sonuçları karşılaştırılmıştır.

Bulgular: 110 *P. aeruginosa* suşunun % 86'sı idrar, trakeal aspirat, kan ve yara örneklerinden izole edilmiştir. Reanimasyon Yoğun Bakım, Dahiliye Yoğun Bakım, Genel Cerrahi ve Nöroloji servisleri etkenin en sık izole edildiği ünitelerdir. İzolatların

en duyarlı oldukları antibiyotikler sırasıyla; kolistin, seftazidim, sefepim, amikasin, piperasilinler ve siprofloksasindir. Duyarlılık oranı % 100 olan kolistin ile seftazidim ve sefepim arasında anlamlı etkinlik farkı bulunmamıştır($p>0,10$). Seftazidim ve sefepim ile karbapenemler arasındaki etkinlik farkı ileri derecede anlamlıdır($p:<0,0001-0,002$). Aminoglikozidler arasında duyarlılık oranı en yüksek olan amikasindir. Netilmisin, imipenem, aztreonam ve meropenem sırasıyla izolatların en dirençli oldukları antimikrobiyallerdir. Disk indüksiyon yöntemi ile izolatların % 90'ında İBL pozitif bulunmuştur. Kombine disk testi ve MBL E testin her ikisi ile pozitif sonuç veren iki izolat MBL üreten izolatlar olarak kabul edilmiştir. Tüm izolatlar içinde MBL pozitif olanların oranı % 1,8'dir.

Sonuç: Hastanemizde *P. aeruginosa* infeksiyonlarının ampirik tedavisinde en çok tercih edilen ilaç grubu olmaları nedeniyle, karbapenemlere(özellikle imipeneme) direnç oranı diğer beta laktam antibiyotiklere göre yüksektir. *P. aeruginosa* izolatlarının % 90'ı İBL üretmekte olduğundan, duyarlılık oranı çok yüksek olan seftazidim, sefepim veya piperasilin/tazobaktamın ampirik tedavide bir diğer antipseudomonal ilaç grubu ile kombine kullanımı, tek başına karbapenem kullanımına göre çok daha etkili bir tedavi yaklaşımı olabilir.

MBL enzimi tarama testleri olarak IMP/EDTA Kombine disk testi ile MBL E test çalışmamızda birbirleriyle % 86 uyumlu bulunmuş olup, modifiye Hodge testi tutarsız sonuçlar vermiştir. MBL E test kadar güvenli, basit ve hızlı ayrıca; E teste göre maliyeti çok daha düşük olan IMP/EDTA Kombine disk testi, rutin laboratuvar çalışmalarında *P. aeruginosa* izolatlarında MBL taraması için uygun olabilir. Bu test sayesinde MBL pozitif izolatların hızla saptanması ve infeksiyon kontrol önlemlerinin etkin olarak uygulanması mümkün olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiyotik duyarlılığı, indüklenebilir beta-laktamaz, metallo beta-laktamaz.

8. SUMMARY

DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE, INDUCIBLE BETA-LACTAMASE AND METALLO BETA-LACTAMASE RATES FOR NOSOCOMIAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES IN TURGUT ÖZAL MEDICAL CENTER WITHIN 2009 YEAR

Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* that cause nosocomial infections is naturally resistant to many antibiotics. Amongst hospitals, bacterial resistance to currently used antibiotics may alter. Beta-lactamase enzymes and various resistance mechanisms cause to antibiotic resistance.

This study aims to investigate antibiotic resistance and inducible beta-lactamase and metallo beta-lactamase rates of *P. aeruginosa* strains that isolated from nosocomial infections. Another aim of this study was to compare the three different phenotypic methods for screening of MBL production.

Materials and Methods: *P. aeruginosa* isolates were identified by conventional methods. According to the standards of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), antibiotics susceptibility tests were performed by Kirby-Bauer disk diffusion method. Imipenem and meropenem E test (AB Biodisk, Sweden) were used for verification of carbapenem resistance. Disk induction method was used for determination of IBL production. Modified Hodge test and imipenem/EDTA Combined disk test and MBL E test were used for detection of MBL production and the results of these tests were compared.

Findings: Eighty-six percent of 110 *P. aeruginosa* strains have been isolated from urine, tracheal aspirates, blood and wound specimens. *P. aeruginosa* were most

frequently isolated from patients in Anesthesia and Reanimation Intensive Care Unit, Internal Medicine Intensive Care Unit, Clinic of General Surgery and Neurology service. *P. aeruginosa* isolates were most susceptible to antibiotics respectively, colistin, ceftazidime, cefepime, amikacin, piperacillin and ciprofloxacin. One hundred percent of isolates were susceptible to colistin whereas, there was no statistical difference for activity between colistin and ceftazidime, cefepime antibiotics ($p>0.10$). Ceftazidime and cefepime were found significantly more active than carbapenems ($p<0,0001-0,002$). Among aminoglycosides, amikacin has the highest susceptibility rate. Netilmicin, imipenem, aztreonam, and meropenem, respectively they have the most resistance rates for *P. aeruginosa* isolates. IBL disk induction method was positive in 90% of the isolates. Two isolates that gave positive results with both of the Combined disk test and the MBL E test were considered as MBL producing isolates. Among all of the isolates, MBL positivity rate was found as 1,8%.

Results: The resistance rates to carbapenems (especially to imipenem) were higher than the other beta lactam antibiotics, because of, they are preferred antibiotics for the empiric therapy of *P. aeruginosa* infections in our hospital. Because of, the susceptibility rates to ceftazidime, cefepime or piperacillin/tazobaktam were very high, combined use of these antibiotics with other antipseudomonal drugs may be a much more effective approach for empiric treatment of *P. aeruginosa* infections, compared to stand-alone carbapenem usage. As a screening test for MBL enzymes IMP/EDTA Combined disk test and MBL E test in our study were consistent with each other 86%, and the modified Hodge test yielded inconsistent results. IMP/EDTA Combined disk test is safe, simple and fast as much as MBL E test; it also has a much lower cost compared to MBL E test. IMP/EDTA Combined disk test may be suitable for screening of MBL producing isolates in routine laboratory studies. Rapid detection of MBL positive isolates and effective implementation of infection control measures are possible owing to IMP/EDTA Combined disk test.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic susceptibility, inducible beta-lactamase, metallo beta-lactamase.

9. KAYNAKLAR

1. National Nosocomial Infections Surveillance(NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32(8):470-485.
2. Leblebicioğlu H, Unal S. The organization of hospital infection control in Turkey . *J Hosp Infect* 2002; 51(1):1-6.
3. Erbaydar S, Eksik A, Erbaydar T, Bilge O, Bulut A. Estimation of increased hospital stay due to nosocomial infections in surgical patients: comparison of matched groups. *J Hosp Infect* 1995; 30:149-154.
4. Khan MM, Celik Y. Cost of nosocomial infection in Turkey: an estimate based on the university hospital data. *Health Serv Manage Res* 2001; 14:49-54.
5. Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG. The nationwide nosocomial infection rate: a new need for vital statistics . *Am J Epidemiol* 1985; 121:159-167.
6. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin M H et al. The prevalence of nosocomial infections in intensive care units in Europe: Results of the European Prevalence infection in Intensive Care (EPIC) Study . *JAMA* 1995; 274(8):639-644.
7. Morrison AJ, Jr., Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1984; 6 Suppl 3:S627-S642.
8. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller A, Tenover FC, Tenover FC, ed(s). *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 1999: 517-525.
9. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34:634-640.
10. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, ed(s). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone 2005: 2587-2615.
11. Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 1998; 27 Suppl 1:S93-S99.
12. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(6):321-331.
13. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2):306-325.
14. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):557-584.
15. Gür D. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. In: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, ed(s). *Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları*. 1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2003: 31-41.

16. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med 2002; 95 Suppl 41:22-26.
17. Bronzwaer S, Lonnroth A, Haigh R. The European Community strategy against antimicrobial resistance. Euro Surveill 2004; 9(1):30-34.
18. Borg MA, Cookson BD, Zarb P, Scicluna EA. Antibiotic Resistance Surveillance and Control in the Mediterranean region: report of the ARMed Consensus Conference. J Infect Dev Ctries 2009; 3(9):654-659.
19. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Pseudomonads, Acinetobacters, & Uncommon Gram-Negative Bacteria. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, ed(s). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. USA: The McGraw-Hill Companies. 2007:263-267
20. Pitt TL, Simpson AJH. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. In: Gillespie SH, Hawkey PM, ed(s). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2th ed. U.K.: John Wiley and Sons, Ltd ; 2006: 427-435
21. Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams Wilkins. 2006: 317-323.
22. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 6th ed. Philadelphia, USA: Mosby Elsevier. 2008: 333-338
23. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control 1988; 16(3):128-140.
24. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(6):1379-1382.
25. Sanders CC. beta-Lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. Clin Infect Dis 1992; 14(5):1089-1099.
26. Cunha BA. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. Semin Respir Infect 2002; 17(3):231-239.
27. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control 2006; 34(Suppl 1):S3-10.
28. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect 2004; 10(1):12-26.
29. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(2):479-487.
30. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. Clin Infect Dis 1998; 27(Suppl 1):S32-S41.
31. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis 2003; 36(Suppl 1):S11-S23.
32. Rice LB, Bonomo RA. The Red Menace: Emerging Issues in Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacilli. Curr Infect Dis Rep 1999; 1(4):338-346.
33. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 2009; 58(9):1133-1148.

34. Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(5):1085-1090.
35. Nakajima A, Sugimoto Y, Yoneyama H, Nakae T. High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol Immunol* 2002; 46(6):391-395.
36. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (Suppl 2):S120-S126.
37. Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 27(Suppl 1):S54-S63.
38. Sykes RB, Matthews M. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2(2):115-157.
39. Nakae T, Nakajima A, Ono T, Saito K, Yoneyama H. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(5):1301-1303.
40. Vedel G, Belaouaj A, Gilly L, Labia R, Philippon A, Nevot P et al. Clinical isolates of *Escherichia coli* producing TRI beta-lactamases: novel TEM-enzymes conferring resistance to beta-lactamase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30(4):449-462.
41. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(9):1697-1704.
42. Jack GW, Richmond MH. A comparative study of eight distinct beta-lactamases synthesized by gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol* 1970; 61(1):43-61.
43. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(6):1211-1233.
44. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(3):259-263.
45. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289(1036):321-331.
46. Sacha P, Wiczorek P, Hauschild T, Zorawski M, Olszanska D, Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46(2):137-142.
47. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42(2):128-131.
48. Langaee TY, Gagnon L, Huletsky A. Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3):583-589.

49. Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Hoiby N. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(11):3406-3411.
50. Bradford PA. What's New in beta-lactamases? *Curr Infect Dis Rep* 2001; 3(1):13-19.
51. Rice L. Evolution and clinical importance of extended-spectrum beta-lactamases. *Chest* 2001; 119(2 Suppl):391S-396S.
52. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(8):2385-2392.
53. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(10):2265-2269.
54. Bert F, Ould-Hocine Z, Juvin M, Dubois V, Loncle-Provot V, Lefranc V et al. Evaluation of the Osiris expert system for identification of beta-lactam phenotypes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8):3712-3718.
55. Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des* 1999; 5(11):865-879.
56. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(9):2859-2863.
57. Bush K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998; 27 Suppl 1:S48-S53.
58. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3(5):489-495.
59. Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3(2):117-127.
60. Pagani L, Colinon C, Migliavacca R, Labonia M, Docquier JD, Nucleo E et al. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8):3824-3828.
61. Koh TH, Wang GC, Sng LH. Clonal spread of IMP-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals in Singapore. *J Clin Microbiol* 2004; 42(11):5378-5380.
62. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K et al. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(2):349-353.

63. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1):255-258.
64. Xiong J, Hynes MF, Ye H, Chen H, Yang Y, M'zali F et al. bla(IMP-9) and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1):355-358.
65. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12):4693-4702.
66. Hanson ND, Hossain A, Buck L, Moland ES, Thomson KS. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo-beta-lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(6):2272-2273.
67. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2003; 37(1):26-32.
68. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frere JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(2):257-266.
69. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(6):321-331.
70. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7):1584-1590.
71. Riccio ML, Pallecchi L, Fontana R, Rossolini GM. In70 of plasmid pAX22, a bla(VIM-1)-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(4):1249-1253.
72. Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frere JM, Dideberg O. A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol* 2005; 345(4):785-795.
73. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50(5):673-679.
74. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12):4654-4661.

75. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43(1):1-4.
76. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perilli M, Coli A et al. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11):4051-4055.
77. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1:S347-S357.
78. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(1):116-119.
79. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):557-584.
80. A guide to sensitivity testing. Report of the Working Party on Antibiotic Sensitivity Testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27 Suppl D:1-50.
81. Sanders CC, Sanders WE, Jr. beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15(5):824-839.
82. Livermore DM. beta-Lactamases: quantity and resistance. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3 Suppl 4:S10-S19.
83. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 Suppl 1:59-64.
84. Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8):2755-2759.
85. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi R, Lee K et al. Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11):4388-4390.
86. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10):4623-4629.
87. Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmstrom A, Qvarnstrom A et al. Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2):942-944.
88. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1):40-43.
89. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49(1):5-11.

90. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2002; 40(10):3798-3801.
91. Payne DJ, Cramp R, Bateson JH, Neale J, Knowles D. Rapid identification of metallo- and serine beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(5):991-996.
92. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(2):88-91.
93. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4):836-71.
94. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36(5):309-332.
95. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100-S19. In: CLSI WP, editor. 19th informational supplement ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
96. Mansur A, Yetkin F, Kuzucu Ç, Ersoy Y, Durmaz R, Karaman P ve ark. İnönü üniversitesi turgut özal tıp merkezi yoğun bakım ünitelerinde 2007 yılı hastane infeksiyonu etkenleri ve antibiyotik direnç durumu. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2009; 13(2):136-144.
97. Van EJ. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(2):347-352.
98. Yücel M, Yavuz T, Kaya D, Behçet M, Öztürk CE, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranlarının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi. *ANKEM Derg* 2006; 20(3):152-155.
99. Tunçoğlu E, Yenişehirli G, Bulut Y. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2009; 23(2):54-58.
100. Şenbayrak AS, Topkaya A, Oğuzoğlu N, Küçükercan M, Akın ES, Göktaş P. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında imipenem ve meropenem duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi* 2003; 17(4):465-469.
101. Özdemir M, Erayman İ, Türk Dağı H, Baykan M, Baysal B. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2009; 23(3):122-126.
102. Kurtoğlu GK, Bozkurt H, Yaman G, Aygöl K, Bayram Y, Berktaş M. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobik direnci . *Selçuk Tıp Derg* 2008; 21:1-6.
103. Kireççi E, Sevinç İ. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2008; 22(4):209-212.

104. Kalem F, Gündem NS, Feyzioğlu B, Arslan U, Tuncer İ. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2008; 22(3):123-126.
105. Gültekin B, Eyigör M, Aydın N. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* kökenlerinin antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2004; 18(1):1-4.
106. Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın E test ve disk diffüzyon yöntemleri ile araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34:33-36.
107. Eyigör M, Telli M, Tiryaki Y, Okulu Y, Aydın N. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2009; 23(3):101-105.
108. DüNDAR D, Sönmez Tamer G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: üç yıllık değerlendirme. ANKEM Derg 2009; 23(1):17-21.
109. Flamm RK, Weaver MK, Thornsberry C, Jones ME, Karlowsky JA, Sahm DF. Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(7):2431-2436.
110. Raja NS, Singh NN. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. J Microbiol Immunol Infect 2007; 40(1):45-49.
111. Turner PJ. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 60(2):185-192.
112. The National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). EARSS database 2006-2009: Erişim: 30 Nisan 2010. <http://www.rivm.nl/earss/database/>
113. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill 2008; 13(47).
114. Gencer S, Ak O, Benzonana N, Batirel A, Ozer S. Susceptibility patterns and cross resistances of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital of Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2002; 1:2.
115. Gonlugur U, Bakici MZ, Ozdemir L, Akkurt I, Icagasioglu S, Gultekin F. Retrospective analysis of antibiotic susceptibility patterns of respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a Turkish University Hospital. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2003; 2:5.
116. Ersöz G, Otağ F, Bayındır İ, Kandemir Ö, Aslan G, Kaya A. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci ve karbapenemlere dirençli suşlar için meropenemin MİK değerleri. ANKEM Derg 2004; 18(1):28-31.
117. Kadanalı A, Özkurt Z, Erol S, Aktaş AE, Altıparlak Ü, Çelebi F. Atatürk üniversitesi tıp fakültesi araştırma hastanelerinde 2003 yılı hastane infeksiyonları. ANKEM Derg 2004; 18(3):149-152.

118. Kiremitçi A, Durmaz G, AkgünY, Kiraz N, Aybey A, Yelken B. Anestezi yoğun bakım ünitesinde çeşitli klinik örneklerden üretilen mikroorganizmalar ve antibiyotik direnç profilleri: 2003 yılı verileri. *İnfeksiyon Dergisi* 2006; 20(1):37-40.
119. Ardıç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarının karbapenemlere ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2004; 18(3):145-148.
120. Gündüz T, Arısoy A, Algün Ü, Özbakkaloğlu B. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının aminoglikozidlere in-vitro duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2004; 18(4):224-227.
121. Pullukçu H, Aydemir Ş, Turhan A, Tünger A, Özinel MA, Ulusoy S. Normalde steril örneklerden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları: beş yıllık sonuçların değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2006; 20(2):111-116.
122. Güven Ö, Ünver D, Özdemir S, Gönüllü N, Küçükbaşmacı Ö, Altaş K. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008; 38(3-4):112-116.
123. Ekşi F, Bayram A, Balcı İ, Özer G. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37(3):142-146.
124. Fidan I, Çetin Gürel F, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarındaki antibiyotik direnci ve metallo-beta laktamaz sıklığı . *ANKEM Derg* 2005; 19(2):68-70.
125. Gayyurhan E, Zer Y, Mehli M, Akgün S. Yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta laktamaz oranlarının belirlenmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2008; 22 (1):49-52.
126. Durmaz B, Durmaz R, Otlı B, Sonmez E. Nosocomial infections in a new medical center, Turkey. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21(8):534-536.
127. Ersoy Y, Fırat M, Kuzucu Ç, Bayındır Y, Karaaslan Ş, Bilişik G ve ark. İnönü üniversitesi tıp fakültesi hastanesinde hastane infeksiyonları. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2003; 10(3) :133-137.
128. Gülay Z, Biçmen C, Yuluğ N. *Pseudomonas* suşlarında indüklenebilir seftazidimazların araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 1996; 10:329.
129. Fincancı M, Ulutürk R, Eren G, Konuksal C, Sander S, Soysal F ve ark. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde kromozomal beta-laktamazların araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2000; 4:499-505.
130. Şener AG, Karadağ HM, Güngör S, Türker M. Yoğun bakım ünitesinden soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında beta-laktamaz üretiminin araştırılması. *İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi* 2001; 39:15-18.
131. Özgenç O, Urbanlı A, Erdenizmenli M, Fidan N, Arı A. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin çeşitli antimikrobiklere direnç oranlarının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2002; 16(2):179-182.

132. Kandemir O, Ersoz G, Sahin E, Kaya A. Hastanede yatarak tedavi gören hastalardan soyutlanan gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve induklenebilir kromozomal beta-laktamaz sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2002; 32:207-211.
133. Oldacay M, Oldacay S, Erdem G. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında kromozomal beta-laktamaz yapımı. *İnfeksiyon Dergisi* 2003; 17:197-199.
134. Küçükateş E, Kansız E, Gültekin N. Yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen Gram negatif çomaklarda induklenebilir beta-laktamazların araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37(3):138-141.
135. Çelik İ, Cihangiroğlu M, Akbulut A. Hastane kökenli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında induklenebilir beta-laktamaz sıklığı. *Fırat Tıp Dergisi* 2007; 12(4):284-286.
136. Lee K, Park AJ, Kim MY, Lee HJ, Cho JH, Kang JO et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. *Yonsei Med J* 2009; 50(3):335-339.
137. Tetik T.(2008). Süleyman Demirel üniversitesi tıp fakültesi hastanesinde izole edilen Gram negatif nonfermenter bakterilerde metallo-beta-laktamaz enzim aktivitesinin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
138. Dede BY.(2006). Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıkları. Tıpta Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
139. Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Pasteran F, Viale AM, Vila AJ et al. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo- β -lactamases in nonfermentative gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11):5648-5652.
140. Wang J, Zhou JY, Qu TT, Shen P, Wei ZQ, Yu YS et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(5):486-491.
141. Samuelsen O, Buaro L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(4):827-830.
142. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7):3129-3135.
143. Qu TT, Zhang JL, Wang J, Tao J, Yu YS, Chen YG et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol* 2009; 47(4):1136-1142.

144. Andrade SS, Picao RC, Campana EH, Nicoletti AG, Pignatari AC, Gales AC. Influence of disk preparation on detection of metallo-beta-lactamase-producing isolates by the combined disk assay. J Clin Microbiol 2007; 45(6):2058-2060.
145. Bahar MA, Jamali S, Samadikuchaksaraei A. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo-beta-lactamase gene bla(VIM) in a level I Iranian burn hospital. Burns 2009; Article in press. Erişim: 29 haziran 2010, <http://www.sciencedirect.com/>
146. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM et al. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. J Antimicrob Chemother 2004; 54(1):282-283.
147. Özgümüş OB, Caylan R, Tosun I, Sandallı C, Aydın K, Köksal I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a University Hospital in Turkey. Microb Drug Resist 2007; 13(3):191-198.
148. Yakupogulları Y, Poirel L, Bernabeu S, Kizirgil A, Nordmann P. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey. J Antimicrob Chemother 2008; 61(1):221-222.
149. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması . Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34:248-252.
150. Toraman AZ, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 2005; 19(1):101-105.
151. Cesur S, Yıldız E, Irmak H, Gülay Z, Aslan U, Özen NS ve ark.(18-20 mayıs 2007). Türkiye'de karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* suşlarında metallo-beta-laktamaz enzimlerinin araştırılması: suşların tedavide kullanılabilen antibiyotikler için minimal inhibitör konsantrasyon(Mic) değerlerinin belirlenmesi.(P047 nolu poster). 3. Ulusal Yoğun bakım İnfeksiyonları Simpozyumu, Nevşehir.

